Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Priscila Santos da Silva

Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato

Rio de Janeiro

2015

Priscila Santos da Silva

Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos.

Orientadoras: Lilian Ferreira de Senna
Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Dalva Cristina Baptista do Lago

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

S586 Silva, Priscila Santos da
Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato. / Priscila Santos da Silva. – 2015.
147f.

Orientador: Lilian Ferreira de Senna
Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Dalva Cristina Baptista do Lago
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Corrosão – Teses. 2. Microbiologia – Teses. 3. Aço-carbono – Teses. I. Senna, Lilian Ferreira de. II. Gonçalves, Márcia Monteiro Machado. III. Lago, Dalva Cristina Baptista do. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 620.193

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

_____ _____

Assinatura Data

Priscila Santos da Silva

Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos.

Aprovada em 8 de maio de 2015.

Orientadoras:

Prof[a]. Dra. Lilian Ferreira de Senna

Instituto de Química – UERJ

Prof[a]. Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves

Instituto de Química – UERJ

Prof[a]. Dra. Dalva Cristina Baptista do Lago

Instituto de Química – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Instituto de Química – UERJ

_____

Prof[a] Dra Flávia Carvalho de Souza

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

_____

Dr. Walter Barreiro Cravo Júnior

Instituto Nacional de Tecnologia

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada seria possível, e em meio a tantos obstáculos me deu força para que pudesse superá-los.

Às minhas orientadoras Lilian Senna, Márcia Machado e Dalva Lago, por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e imprescindível ajuda durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, Cida e Pedro, pelo apoio e educação, construindo a base para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha irmã Gabriela, por me incentivar, me escutar e estar ao meu lado, sentindo orgulho de mim a cada conquista.

Ao meu namorado Rodrigo, por ser essa pessoa tão fundamental em minha vida, por seu apoio, compreensão e amor.

À minha amiga Michele Torres, por sua amizade leal, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha amiga de infância Regina Soares, por estar presente na minha vida por todos esses anos, me incentivando e apoiando.

À minha amiga Thais Machado, amizade que fiz no mestrado, por seu companheirismo e por ser essa pessoa tão especial que meu deu todo o apoio, incentivo e força necessários durante esta jornada.

À minha amiga Carla Soares, que conheci na graduação e que também foi minha companheira durante o mestrado, me ajudando nesta etapa, principalmente na realização das disciplinas.

Aos amigos do laboratório de tecnologia de processos bioquímicos (DTPB), principalmente à Mariana de Paula, pela amizade, apoio, conselhos e por toda ajuda de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório LEC, especialmente ao técnico Antonio de Castro, por compartilhar seus conhecimentos, por sua boa vontade e paciência, sempre ajudando a solucionar os problemas que surgiam ao longo dos ensaios eletroquímicos.

Ao professor Antonio Costa por ceder a cultura bacteriana, disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos, bem como emprestar materiais e equipamentos quando necessário.

À técnica Márcia Carreira do laboratório de bioprocessos pela ajuda e atenção sempre que foi preciso.

À professora Deborah Vargas, por ceder o cilindro de gás nitrogênio, essencial para a realização dos experimentos.

Ao técnico Isaac Albert pela atenção durante a realização da análise de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia (INT) por ceder a cultura bacteriana.

Ao PPGEQ pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse chegar ao final de mais uma etapa na vida, muito obrigada.

RESUMO

SILVA, Priscila Santos. *Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato*. 2015. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são os principais micro-organismos envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Estas bactérias reduzem o sulfato, tendo como resultado a produção de H_2S, o que pode influenciar os processos anódico e catódico na corrosão de materiais metálicos em ambientes marinhos, óleos e solos úmidos. Uma das formas de prevenir e controlar esse tipo de corrosão é a adição de biocidas ao meio corrosivo. Esta dissertação tem como objetivo avaliar o uso de biocidas no controle da CMI do aço AISI 1020 por BRS. Para isto, o comportamento da CMI no aço foi avaliado em água do mar sintética, em condições de anaerobiose, na ausência e na presença de uma cultura mista contendo BRS. Um biocida natural (óleo de alho) e outro comercial (glutaraldeído) foram utilizados para controlar a corrosão causada por estas bactérias. Duas formas de adição de biocida foram avaliadas: antes da formação do biofilme e após sua formação na superfície do metal. O crescimento microbiano na superfície do aço foi avaliado através da quantificação das BRS sésseis, pelo método do número mais provável (NMP). O comportamento eletroquímico do aço, na ausência e na presença de BRS e também para os ensaios com biocidas, foi estudado através das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e polarização potenciodinâmica, sempre usando água do mar sintética como meio eletrolítico. A formação de biofilme e de produtos de corrosão na superfície do aço foi observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que o aço exposto ao meio contendo BRS apresentou um processo corrosivo mais acelerado, quando comparado aos sistemas na ausência de micro-organismo. Esse processo foi evidenciado por um decréscimo na magnitude do arco capacitivo, nos ensaios de EIE, e um aumento da densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), nos ensaios de polarização. Na análise de MEV, foi possível observar a formação de corrosão localizada após a remoção do biofilme da superfície. Os ensaios com biocidas, adicionados antes da formação de biofilmes, mostraram uma redução no número de bactérias sésseis, quando comparados com os ensaios sem biocida realizados pelo mesmo período de tempo (7 dias). Foi verificado também um decréscimo do processo corrosivo do aço, evidenciado através de aumento nos arcos capacitivos, nos ensaios de EIE e pelos menores valores de I_{corr} nos ensaios de polarização, quando comparados com o biofilme formado sem biocidas, nas mesmas condições. Apesar de não ter inibido completamente o crescimento das BRS sésseis, o óleo de alho apresentou maior redução no processo corrosivo quando comparado ao glutaraldeído, indicando sua possível aplicação como biocida natural nestas condições. Os ensaios realizados com biocidas adicionados após a formação do biofilme mostraram que o glutaraldeído apresentou alta eficácia em reduzir o número de células sésseis. Já o óleo de alho exibiu uma ação menos efetiva, sugerindo que este composto não conseguiu penetrar completamente a matriz do biofilme. Entretanto, ambos causaram aceleração do processo corrosivo do aço no meio estudado após 7 dias de exposição.

Palavras-chave: Corrosão microbiologicamente induzida. Bactérias redutoras de sulfato. Técnicas eletroquímicas. Biocidas. Óleo de alho. Glutaraldeído.

ABSTRACT

SILVA, Priscila Santos. *Evaluation of biocides on the control of microbiologically-influenced corrosion of 1020 carbon steel by sulfate-reducing bacteria*. 2015. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are the most important microorganisms involved in the microbiologically-influenced corrosion (MIC). These bacteria reduce sulfate, resulting in the production of H_2S, which may influence the anodic and cathodic processes in the corrosion of metallic materials in marine environments, oil and wet soils. One way to prevent and control this type of corrosion is the addition of biocides to the corrosive environment. This work aims to evaluate the use of biocides to control MIC of AISI 1020 steel by SRB. For this, the behavior of MIC in carbon steel was evaluated in artificial seawater, under anaerobic conditions, in the absence and in the presence of a mixed culture containing SRB. A natural biocide (garlic oil) and a commercial one (glutaraldehyde) were used to control the corrosion caused by these bacteria. Two ways of biocide addition were evaluated: before the formation of biofilm and after its formation on the metal surface. Microbial growth on the steel surface was evaluated by quantifying the sessile SRB, by using the most probable number method (MPN).The electrochemical behavior of the steel in the absence and presence of SRB, as well as in the experiments containing the biocides, was studied by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and potentiodynamic polarization, always using artificial seawater as the electrolytic medium. The biofilm formation and the corrosion products on the steel surface were observed by scanning electron microscopy (SEM).The results showed that the steel exposed to medium containing SRB exhibited an accelerated corrosion process when compared to systems without the microorganisms. This process was evidenced by a decrease in the magnitude of the capacitive loop, in EIS experiments, and an increase of the corrosion current density (I_{corr}), in polarization tests. By SEM analysis, it was possible to observe the formation of localized corrosion after the biofilm removal. The experiments with biocides, added before the formation of biofilms, showed a reduction in the number of sessile bacteria, compared with the tests without biocide performed on the same time period (7 days). It was also found a decrease in steel corrosive process, evidenced by an increase in the capacitive loops in the EIS tests, and by the smaller I_{corr} values in polarization tests, when compared to the biofilm formatted without biocides under the same conditions. Although it has not completely inhibited the growth of BRS sessile, garlic oil showed a greater reduction in corrosion process when compared to glutaraldehyde, indicating its possible application as a natural biocide under these conditions. The experiments performed with biocides added after the biofilm formation showed that glutaraldehyde exhibited high efficacy in reducing the number of sessile cells. On the contrary, the garlic oil exhibited a less effective action, suggesting that this compound could not completely penetrate the biofilm matrix. However, both biocides accelerated the steel corrosion process in the studied medium after 7 days of exposure.

Keywords: Microbiologically induced corrosion. Sulfate-reducing bacteria. Electrochemical techniques. Biocides. Garlic oil. Glutaraldehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da formação de biofilmes..... 21
Figura 2- Esquema exemplificando a corrosão uniforme e por pites..... 22
Figura 3- Principais morfologias das BRS..... 26
Figura 4- Representação do metabolismo das BRS..... 27
Figura 5- Bioquímica da redução dissimilativa de sulfato..... 28
Figura 6- Esquema da despolarização catódica..... 32
Figura 7- Biocorrosão por aeração diferencial..... 33
Figura 8- Exemplo de diagrama de Nyquist para um processo de corrosão em aço carbono por BRS..... 38
Figura 9- Exemplos de diagramas de Bode e fase para um processo de tratamento de biofilmes formados por *P. fragi* e BRS, empregando um antibiótico (Amp)..... 39
Figura 10- Exemplo de um modelo simples de circuito elétrico utilizado para simular dados de EIE..... 40
Figura 11- Exemplo de tipos de circuitos elétricos usados na simulação dos dados de EIE..... 41
Figura 12- Representação esquemática dos métodos potenciostático e potenciodinâmico para obtenção das curvas de polarização..... 43
Figura 13- Representação das curvas de polarização em um diagrama monologarítmico 44
Figura 14- Corpos de prova utilizados nos ensaios de quantificação celular e Eletroquímicos..... 60
Figura 15- Reatores dos ensaios de quantificação microbiana com o corpo de prova suspenso por fita teflon..... 64
Figura 16- Reatores dos ensaios eletroquímicos..... 65
Figura 17 - Exemplificação do método de quantificação microbiana por NMP..... 68
Figura 18 - Célula eletroquímica contendo os três eletrodos..... 69
Figura 19 - Quantificação microbiana para BRS sésseis..... 71
Figura 20- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 após 7 dias de imersão em meio contendo BRS. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)..... 73
Figura 21- Potencial de circuito aberto no aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para todos os tempos de imersão, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico)..... 75
Figura 22- Diagramas de Nyquist para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico)..... 76

Figura 23- Diagramas de Bode para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico)..... 78
Figura 24- Diagramas de Fase para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico)..... 80
Figura 25- A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para todas as condições, , exceto o ensaio biótico 28 dias. B: Exemplo de simulação usando o circuito proposto para o ensaio biótico com 7 dias..... 83
Figura 26- A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para o ensaio biótico com 28 dias B: Simulação para o ensaio biótico com 28 dias utilizando o circuito proposto..... 84
Figura 27- Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico)..... 88
Figura 28- Quantificação microbiana de células de BRS sésseis para os ensaios com biocidas, aplicados antes da formação do biofilme, e para o ensaio controle..... 93
Figura 29- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 incubado em meio contendo óleo de alho por 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme, com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)..... 96
Figura 30- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 incubado em meio contendo glutaraldeído por 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme, com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)..... 97
Figura 31- Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética..... 99
Figura 32- Diagramas de Nyquist, Bode e Fase para o aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética..... 101
Figura 33- Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme. B- Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel..... 103
Figura 34- Quantificação microbiana para ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas..... 107
Figura 35- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o óleo de alho foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície

após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)..... 108
Figura 36- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o glutaraldeído foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)..... 109
Figura 37- Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas 111
Figura 38- Diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas..... 113
Figura 39- A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. B: Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel..... 116
Figura 40- Quantificação microbiana para ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 7dias..... 119
Figura 41- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o óleo de alho foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)..... 120
Figura 42- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que glutaraldeído foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)..... 121
Figura 43- Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias 123
Figura 44- Diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias..... 125
Figura 45- A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para o ensaio em que glutaraldeído foi aplicado ao meio após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. B: Simulação para o ensaio glutaraldeído após formado o biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, usando o circuito proposto..... 127
Figura 46- A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. B: Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aplicações do glutaraldeído no controle de BRS..... 54
Tabela 2- Composição química do alho *in natura* em porção de 100 gramas..... 57
Tabela 3- Composição química do aço carbono AISI 1020..... 60
Tabela 4- Composição da água do mar sintética (quantidade para o preparo de 10L)..... 61
Tabela 5- Composição do meio Baar's modificado utilizado para o crescimento microbiano..... 63
Tabela 6- Composição da solução de diluição..... 67
Tabela 7- Composição do meio Postgate E modificado para a quantificação microbiana..... 67
Tabela 8- Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono em meio de água do mar sintética, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico), usando os circuitos equivalentes das Figuras 25A e 26A..... 85
Tabela 9- Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para todas as condições de ensaio, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico)..... 90
Tabela 10- Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE para o aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente da Figura 25A..... 102
Tabela 11- Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme..... 104
Tabela 12- Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono 1020 para os ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme por um tempo de contato de 24 horas, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente das Figuras 25A (óleo de alho) e 26A (glutaraldeído)..... 114
Tabela 13- Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas..... 117
Tabela 14- Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono 1020 para os ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme por um tempo de contato de 7 dias, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente das Figuras 25A (óleo de alho) e 45A (glutaraldeído)..... 128
Tabela 15- Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias..... 130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS	Adenosina Fosfosulfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
DRX	Difração de Raios X
E_{corr}	Potencial de Corrosão
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
EFC	Elemento de Fase Constante
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
$F_{máx}$	Frequência máxima
I_{corr}	Densidade de Corrente de Corrosão
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura à Laser
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEVA	Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental
MFA	Microscopia de Força Atômica
NMP	Número Mais Provável
OCP	Potencial de Circuito Aberto (*Open Circuit Potential*)
Pig	Dispositivo para inspeção de dutos (*Pipeline inspection gauge*)
PNB	Produto Nacional Bruto
R_e	Resistência do eletrólito
R_{tc}	Resistência de transferência de carga
SPE	Substância Polimérica Extracelular
THPS	Sulfato de Tetraquishidroximetil Fosfônio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.....	20
1.1	**Corrosão Microbiologicamente Induzida**.....	20
1.2	**Biofilmes**.....	20
1.3	**Formas de Biocorrosão**.....	22
1.4	**Micro-organismos envolvidos na biocorrosão**.....	22
1.4.1	Bactérias.....	23
1.4.2	Bactérias redutoras de sulfato.....	25
1.4.2.1	Metabolismo das BRS.....	26
1.4.2.2	BRS e os casos de biocorrosão.....	29
1.5	**Mecanismos envolvidos na biocorrosão**.....	30
1.5.1	Formação de Ácidos.....	31
1.5.2	Despolarização Catódica.....	31
1.5.3	Aeração diferencial.....	32
1.5.4	Inativação dos inibidores de corrosão.....	33
1.6	**Monitoramento da biocorrosão**.....	34
1.6.1	Métodos microbiológicos.....	34
1.6.2	Métodos físico-químicos.....	35
1.6.3	Métodos de avaliação qualitativo e semi-quantitativo da CMI.....	35
1.6.4	Métodos eletroquímicos.....	37
1.6.4.1	Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	37
1.6.4.2	Polarização potenciodinâmica.....	42

1.7 **Métodos de prevenção e controle da biocorrosão**..... 44

1.7.1 Procedimentos de limpeza..... 45

1.7.2 Revestimentos..... 46

1.7.3 Proteção catódica..... 46

1.7.4 Biocidas..... 47

1.7.4.1 Principais biocidas empregados no controle da biocorrosão..... 49

1.7.4.1.1 Biocidas oxidantes..... 50

1.7.4.1.2 Biocidas não oxidantes..... 50

1.7.4.1.3 Biocidas naturais..... 56

1.8 **Alho (*Allium sativum*)**..... 57

2 **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 60

2.1 **Corpos de prova**..... 60

2.2 **Fluido de Processo e Meio de Cultura**..... 61

2.3 **Biocidas**..... 63

2.4 **Sistemas utilizados para os ensaios de quantificação microbiana e eletroquímicos –Abióticos e Bióticos**..... 64

2.5 **Sistema utilizado para os ensaios com biocidas**..... 65

2.5.1 Biocidas aplicados antes da formação do biofilme..... 66

2.5.2 Biocidas aplicados após a formação do biofilme..... 66

2.6 **Quantificação Microbiana**..... 66

2.7 **Ensaios eletroquímicos**..... 68

2.8 **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**..... 70

3 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 71

3.1 **Avaliação da CMI por BRS em comparação com um ensaio abiótico**..... 71

3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano..... 71

3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 72

3.1.3 Ensaios eletroquímicos..... 74

3.1.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)..... 74

3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)..... 75

3.1.3.3 Polarização Potenciodinâmica..... 87

3.2 **Ensaios com biocidas aplicados antes da formação do biofilme**..... 92

3.2.1 Avaliação do crescimento microbiano..... 92

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 95

3.2.3 Ensaios eletroquímicos..... 98

3.2.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)..... 98

3.2.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)..... 100

3.2.3.3 Polarização Potenciodinâmica..... 103

3.3 **Ensaios com biocidas aplicados após a formação do biofilme**..... 106

3.3.1 Tempo de contato de 24 horas..... 106

3.3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano..... 106

3.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 107

3.3.1.3 Ensaios eletroquímicos..... 111

3.3.1.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)..... 111

3.3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)..... 112

3.3.1.3.3 Polarização Potenciodinâmica..... 115

3.3.2 Tempo de contato de 7 dias..... 118

3.3.2.1 Avaliação do crescimento microbiano..... 118

3.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 119

3.3.2.3 Ensaios eletroquímicos..... 123

3.3.2.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)..... 123

3.3.2.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)..... 124

3.3.2.3.3 Polarização Potenciodinâmica..... 128

CONCLUSÕES..... 132

REFERÊNCIAS..... 138

INTRODUÇÃO

A corrosão pode ser definida como o resultado de alterações em materiais, geralmente metálicos, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente, associada ou não a esforços mecânicos. A deterioração do material devido à corrosão leva a desgastes, variações químicas ou modificações estruturais, tornando-o inapropriado ao uso. Os problemas relacionados à corrosão são frequentes, podendo ocorrer nas mais variadas áreas, tais como, nas indústrias química, petroquímica, naval, de construção civil e automobilística, assim como na medicina e em outros setores produtivos. Estes problemas causam perdas econômicas que podem ser diretas, quando associadas com a substituição de equipamentos e manutenção dos processos de proteção e indiretas, quando relacionados com paralisações acidentais, perda de produto, contaminação de produto e perda de eficiência (GENTIL, 2011).

Quando micro-organismos estão envolvidos na corrosão de superfícies metálicas, esta é denominada corrosão microbiologicamente induzida (CMI), também chamada de biocorrosão. Os micro-organismos aderem às superfícies formando biofilmes, que podem influenciar a corrosão através de alterações nas condições eletroquímicas na interface metal/solução (VIDELA e CHARACKLIS, 1992).

O principal grupo de micro-organismos envolvidos no processo de biocorrosão são as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Estas bactérias reduzem o sulfato, tendo como resultado a produção de sulfeto de hidrogênio (dependendo do pH do meio), o que pode influenciar os processos anódico e catódico na corrosão de materiais metálicos em ambientes marinhos, óleos e solos úmidos. As BRS são capazes de se aderirem à superfície do aço formando biofilme e produtos de corrosão, como camadas porosas de sulfeto de ferro resultantes de seu metabolismo, favorecendo a aceleração do processo corrosivo principalmente através da formação de corrosão localizada.

Um monitoramento efetivo do sistema em que um processo de biocorrosão está presente é necessário para estudar o processo de corrosão causado pela atividade microbiana. Assim, o monitoramento do sistema deve fornecer informações sobre o ataque corrosivo, a qualidade da água, as populações bacterianas planctônicas e sésseis, as características dos biofilmes, e a composição química e biológica dos depósitos inorgânicos presentes sobre o material (VIDELA

E HERRERA, 2005). Para isso são utilizados vários métodos como os microbiológicos, físico-químicos, microscópicos e eletroquímicos.

Dentre os métodos de prevenção e controle empregados nos casos de biocorrosão estão os biocidas. Estes são compostos utilizados para prevenir, inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998). Os biocidas são muito utilizados para controlar a biocorrosão, porém a maioria apresenta a desvantagem de ser tóxico para os seres humanos e também para o ambiente. Assim, os compostos naturais, tais como extratos de plantas e alimentos podem ser considerados como uma forma ambientalmente favorável no tratamento da biocorrosão e vem sendo bastante explorado atualmente como uma alternativa aos biocidas comerciais (BHOLA et al., 2014; KORENBLUM et al., 2013). Dentre os compostos naturais, o alho apresenta-se como uma possibilidade no tratamento da biocorrosão, já que este possui propriedades bactericidas (BENKEBLIA, 2004; CAÑIZARES et al, 2004; ZALEPUGIN et al, 2010) e também pode agir como inibidor natural de corrosão para o aço carbono em meio ácido (PEREIRA et al., 2012; AFIA et al., 2014).

Dessa forma, faz-se necessário avaliar o comportamento das BRS na corrosão do aço carbono, uma vez que este material é muito utilizado na indústria de petróleo e gás e também em estruturas presentes em ambientes marinhos (pontes, cais, dutos e plataformas), para tentar evitar os problemas relacionados com este tipo de corrosão utilizando métodos de prevenção e controle. Assim, este trabalho propôs a avaliação da ação de biocidas no controle da biocorrosão do aço carbono AISI 1020 em água do mar sintética, empregando um biocida natural, o óleo de alho, e um biocida comercial, o glutaraldeído.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ação de biocidas no controle da corrosão microbiológica no aço carbono AISI 1020 em água do mar sintética por bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Objetivos Específicos

- Estudar o crescimento microbiano de uma cultura mista de BRS, correlacionando-o com a corrosão do aço através das técnicas eletroquímicas de impedância e polarização.
- Verificar a formação de biofilme na superfície do aço carbono, bem como identificar um possível ataque ao substrato após a remoção deste biofilme, por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Controlar a corrosão microbiológica do aço carbono por BRS através da adição de biocidas, sendo estes aplicados de forma a evitar a formação do biofilme, e também após os biofilmes já formados.
- Avaliar o efeito dos biocidas no controle da corrosão microbiológica através das técnicas de quantificação, eletroquímicas e MEV.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Corrosão Microbiologicamente Induzida

Corrosão microbiologicamente induzida (CMI), também chamada de biocorrosão, é o termo utilizado para designar a corrosão devido à presença e atividades de micro-organismos (LITTLE, WAGNER e MANSFELD, 1992). A biocorrosão ocorre quando se estabelece o contato entre as células microbianas e/ou os produtos de seu metabolismo, com a superfície metálica. A partir desse contato formam-se estruturas microbianas chamadas de biofilmes, que se constituem de agregados celulares, matéria orgânica e inorgânica, substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e aproximadamente 95% de água (BEECH, 2004; VIDELA, 2003).

Nas últimas duas décadas a biocorrosão começou a ser amplamente estudada, levando à inter-relação de pesquisadores das mais diferentes áreas, tais como microbiologia, eletroquímica, ciência dos materiais, entre outras. Esse fato tem permitido um avanço considerável no entendimento sobre os aspectos envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (VIDELA, 2003).

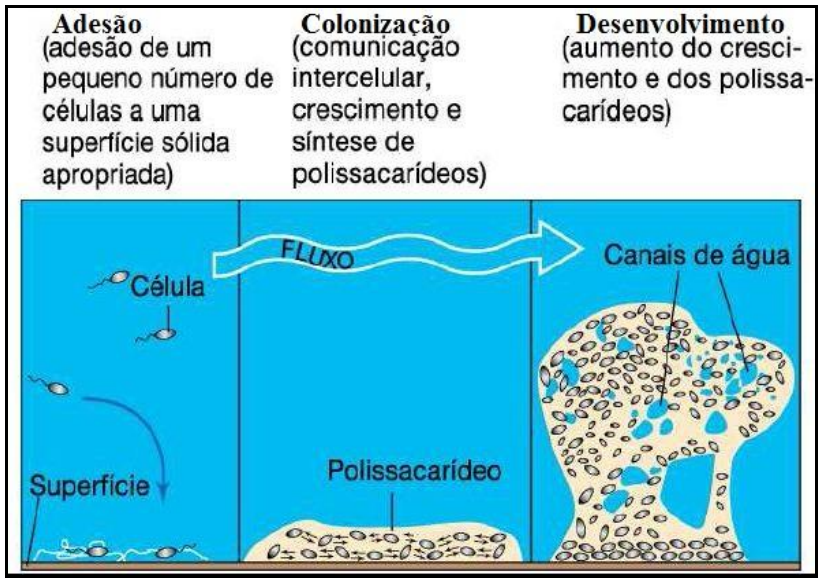
1.2 Biofilmes

Micro-organismos em sistemas aquáticos apresentam a tendência em se aderirem aos mais diversos tipos de superfícies submersas em meios oligotrófico (pouco nutrientes). Dessa forma, passam a colonizar estas superfícies formando os chamados biofilmes. Logo, esse termo se refere ao desenvolvimento de comunidades microbianas sobre superfícies que estão submersas em ambientes aquosos (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990). Os biofilmes (Figura 1) apresentam uma variável distribuição de células e agregados celulares, substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e canais por onde circula a água. Portanto, são estruturas heterogêneas e dinâmicas onde o número de micro-organismos varia a todo instante (FRANÇA, 2006). SPE são considerados uma mistura complexa de macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e

lipídeos, e sua composição varia de acordo com a espécie microbiana, estado fisiológico das células e fatores ambientais (BEECH, SUNEER e HIRAOKA, 2005).

A etapa de formação de biofilme apresentada na Figura 1 se inicia com uma fina película de compostos orgânicos e inorgânicos que altera as cargas eletrostáticas na superfície do metal, facilitando a aderência dos micro-organismos. Em seguida ocorre a adesão e colonização dos micro-organismos aeróbios. Rapidamente os micro-organismos se multiplicam e produzem SPE, resultando na formação do biofilme. Posteriormente ocorre o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios internamente ao biofilme. Após estas etapas o biofilme aumenta de espessura, podendo favorecer o desprendimento de camadas mais externas e estas podem voltar a colonizar outras superfícies (VIDELA e HERRERA, 2005).

Figura 1- Representação da formação de biofilmes



Fonte: Madigan et al., 2010.

A presença de biofilmes tem sido identificada como a fonte recorrente de vários problemas industriais, muitos deles com graves consequências. Isto ocorre devido ao fato do biofilme tornar o ambiente químico na superfície diferente daquele da solução, facilitando e estabilizando o processo de corrosão (GEORGE, MARSHALL e NEWMAN, 2003). Isto pode gerar sérios fenômenos de degradação e corrosão nos materiais que lhes servem de suporte (polímeros, concretos, materiais metálicos, etc.). O custo global da corrosão é avaliado em

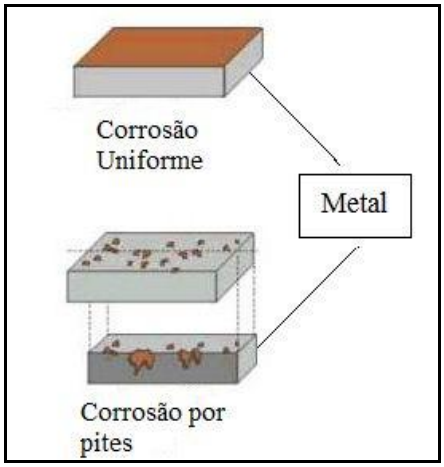
aproximadamente 4% do produto nacional bruto (PNB) dos países industrializados e considera-se que a biocorrosão é responsável por 10% desses custos (FRANÇA, 2006).

1.3 Formas de biocorrosão

A forma de corrosão pela interação dos micro-organismos com a superfície metálica mais comum é a corrosão localizada, podendo ser por pite, por frestas, intergranular, por fragilização por hidrogênio, e corrosão sob tensão (BEECH e GAYLARDE, 1999).

A corrosão localizada por pites é a mais encontrada em biocorrosão. Esta se caracteriza por apresentar cavidades na superfície do metal que possuem o fundo em forma angulosa e profundidade normalmente maior que seu diâmetro (GENTIL, 2011). A Figura 2 apresenta a corrosão localizada por pite em comparação com a corrosão uniforme.

Figura 2- Esquema exemplificando a corrosão uniforme e por pites



Fonte: Portal da galvanização, 2015.

1.4 Micro-organismos envolvidos na biocorrosão

O processo de biocorrosão ocorre através da participação de vários micro-organismos, que podem agir de forma direta ou indireta no ambiente. Normalmente esses micro-organismos atuam em consórcios e não isoladamente (BEECH e GAYLARDE, 1999). Dentre os micro-organismos associados à biocorrosão podemos citar:

- os fungos, que participam do processo podendo iniciar, facilitar ou acelerar as reações de corrosão de materiais metálicos e modificar o meio em que estão presentes devido à produção de metabólitos ácidos (GEWEELY, 2011);
- as algas, que estão relacionadas ao processo de *biofouling* (acúmulo de depósitos biológicos), podendo contribuir para a corrosão de estruturas onde estão incrustadas (VIDELA, 2003); e
- as bactérias, sendo estas as principais envolvidas aos casos de biocorrosão e serão descritas a seguir.

1.4.1 Bactérias

As principais bactérias envolvidas na biocorrosão são bactérias produtoras de exopolissacarídeos, bactérias produtoras de ácido, bactérias oxidantes de ferro, bactérias oxidantes de enxofre e bactérias redutoras de sulfato (BRS). Estas bactérias são comumente encontradas em comunidades como biofilmes e influenciam no processo eletroquímico como consequência de sua atividade metabólica (ZARASVAND e RAI, 2013).

Bactérias produtoras de exopolissacarídeos→Estas bactérias participam do processo de biocorrosão em superfícies metálicas, pois produzem polímeros extracelulares (SPE) que estão intimamente ligados à formação de biofilmes. Dentre estas podemos citar as do gênero *Pseudomonas*, que respondem às condições desfavoráveis de nutrientes, aderindo às superfícies sólidas e produzindo SPE. Por serem bactérias aeróbias, as *Pseudomonas* consomem o oxigênio no interior dos biofilmes, criando condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias

anaeróbias, como as BRS (BEECH e GAYLARDE, 1989). Valcarce, Sanchéz e Vázquez (2005) confirmaram a presença de corrosão localizada por pites em seus estudos para avaliar a corrosão de metais como cobre e bronze por *Pseudomonas fluorescens*. Yuan e Pehkonen (2007) também encontraram corrosão do tipo localizada quando estudaram a influência de *Pseudomonas* sp na corrosão de aço inoxidável. O ataque ocorreu devido a formação de um biofilme espesso por estas bactérias na superfície do metal.

***Bactérias produtoras de ácidos*→** Algumas bactérias heterotróficas excretam ácidos orgânicos durante a fermentação de substratos orgânicos. Estas bactérias, conhecidas como produtoras de ácido, também participam do processo de corrosão, já que excretam substâncias corrosivas no meio ambiente (LITLLE, WAGNER e MANSFELD, 1992). Sowards e Mansfield (2014) avaliaram a corrosão de ligas de cobre e aço por *Acetobacter aceti*, uma bactéria produtora de ácido, em um sistema de simulação de tanques de armazenamento de combustíveis subterrâneo. Os resultados mostraram que tanto as ligas de cobre quanto as de aço sofreram corrosão uniforme e localizada, devido à liberação de ácido acético para o meio.

***Bactérias oxidantes de ferro*→**Estas bactérias oxidam o íon ferroso a férrico, obtendo a energia necessária para seu metabolismo. Como resultado, forma-se o hidróxido de ferro III ($Fe(OH)_3$), que se deposita nas superfícies metálicas formando uma camada de ferrugem, que pode criar zonas de concentração de oxigênio, iniciando um processo de corrosão por frestas (STAROSVETSKY et al., 2001).

Entre as bactérias ferro-oxidantes associadas a processos de corrosão, destaca-se a espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, antigamente conhecida como *Thiobacillus ferrooxidans* (KELLY e WOOD, 2000) e também as dos gêneros *Gallionella*, *Leptothrix*, *Crenothrix* e *Clonothrix* (VIDELA, 2003).

Autores como Xu et al. (2007), Sorkhabi et al. (2011) e Wang et al.(2014) avaliaram a influência destas bactérias na corrosão do aço carbono e constataram que a velocidade do processo corrosivo aumentou na presença destes micro-organismos, sendo observados corrosão uniforme e principalmente corrosão localizada na superfície do aço.

Bactérias oxidantes de enxofre→Grande parte das bactérias envolvidas na biocorrosão faz parte do ciclo biogeoquímico do enxofre na natureza. Enxofre elementar e algumas de suas formas oxidadas são produzidos na natureza por bactérias oxidantes do enxofre (VIDELA, 2003). Dentre essas bactérias, destaca-se o gênero *Thiobacillus*, que são micro-organismos quimioautotróficos aeróbios, os quais utilizam o enxofre elementar como doador de elétrons, levando à formação de ácidos, principalmente o H_2SO_4. Com isso, há redução do pH do meio podendo acelerar o processo corrosivo em materiais metálicos (OH, HASSAN e GINKEL, 2010).

Segundo Tang, Baskaran e Nemati (2009) as bactérias do ciclo biogeoquímico do enxofre possuem importância do ponto de vista ambiental e industrial, pois suas atividades podem criar problemas ambientais ou de processamento, principalmente em indústrias de petróleo e mineração, como por exemplo a corrosão de estruturas de aço. Beech e Campbel (2008) e Lanneluc et al. (2015) confirmaram em seus estudos a influência de bactérias oxidantes de enxofre na corrosão do aço carbono em ambientes marinhos.

1.4.2 Bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato, BRS, são os principais micro-organismos envolvidos no processo de biocorrosão (JAVAHERDASHTI, 1999), e tem sido o foco da maioria das pesquisas realizadas para evitar este tipo de corrosão (VIDELA, 2003).

Observa-se uma grande variação quanto às características morfológicas das BRS, podendo ser ovais, esféricas, na forma de bacilos ou víbrios, entre outras, com 0,4 a 3,0 µm de diâmetro e 3,0 a 5,0 µm de comprimento (Figura 3). Podem ocorrer como células isoladas, em pares ou agregadas. A grande maioria dos gêneros é gram-negativa (GONÇALVES, 2001), podendo ser móveis ou não. No caso das móveis, geralmente se movimentam por meio de um flagelo polar (VIDELA, 2003).

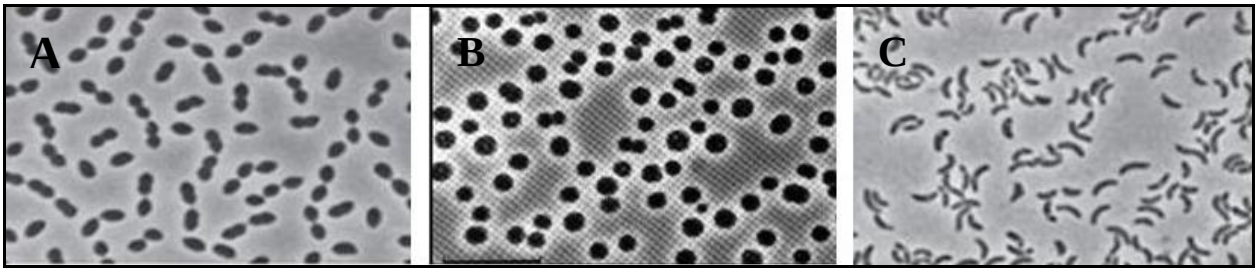
As BRS são micro-organismos anaeróbios, mas segundo Brune, Frenzel e Cypionka (2000), algumas espécies são tolerantes ao oxigênio, podendo até mesmo sobreviver por períodos longos de exposição a este gás. Desenvolvem-se em ambientes com uma faixa de pH entre 7,0 e 7,8, mas podem tolerar uma faixa mais ampla, com variação de pH entre 5,5 a 9,0. Quanto à

temperatura apropriada ao crescimento, estas bactérias podem ser classificadas em dois grupos: mesófilas, que toleram uma temperatura máxima de 45°C e termofílicas que podem crescer em temperaturas superiores a 70°C (ANDRADE, 2013).

Inicialmente, este grupo de bactérias foi classificado em dois gêneros: o *Desulfovibrio* (cinco espécies) e o *Desulfotomaculum* (sete espécies) (VIDELA, 2003). Atualmente, existem mais de 40 gêneros desses micro-organismos coletivamente denominados bactérias redutoras de sulfato (MADIGAN et al., 2010).

O gênero *Desulfovibrio* é o mais facilmente isolado e, por isso, o mais estudado. São bactérias gram negativas, em forma de víbrios ou bacilos e são mesófilos (JAVAHERDASHTI, 1999). Corrosão por este gênero de BRS foi observada em revestimentos de poços petrolíferos, partes externas de tubulações enterradas, poços de águas profundas, sistemas de refrigeração, entre outros (GENTIL, 2011).

Figura 3- Principais morfologias das BRS. (A) *Desulfobulbus* (ovais); (B) *Desulfococcus* (esféricas); (C) *Desulfovibrio* (víbrios ou bacilos)



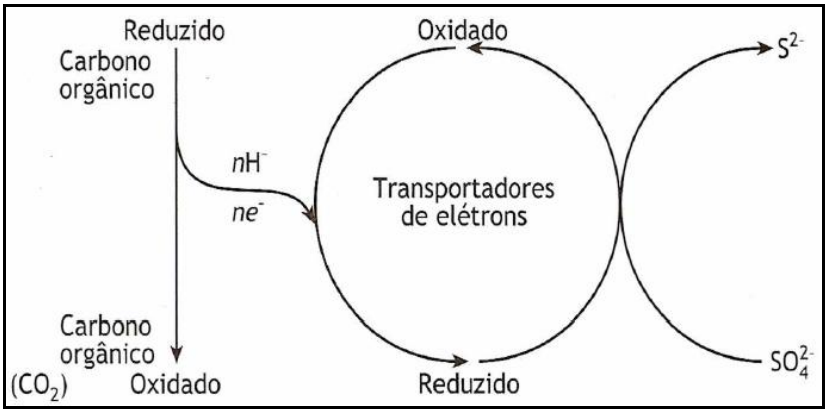
Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2010; Taxonomie des Procaryotes, 2015.

1.4.2.1 Metabolismo das BRS

Em relação ao metabolismo, as BRS podem ser divididas em dois grupos. O grupo I engloba os gêneros que realizam a oxidação incompleta de compostos orgânicos até acetato, utilizando hidrogênio, piruvato, lactato, malato e alguns alcoóis como metanol, etanol, propanol, como substrato energético. Pertencem a este grupo os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*,

Desulfobotulus e *Desulforhopalus*. O grupo II engloba os gêneros que oxidam completamente os compostos orgânicos a CO_2. São eles *Desulfobacter*, Desulfobacterium, *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfomena*, *Desulfosarcina*, *Desulfoarculus*, *Desulfoacinum* e *Desulforhabdus* (TANG, BASKARAN E NEMATI, 2009). A Figura 4 ilustra o metabolismo das BRS que envolve três etapas: a oxidação dos compostos orgânicos (substratos), o transporte de elétrons e a redução dos íons sulfato.

Figura 4- Representação do metabolismo das BRS



Fonte: Videla, 2003.

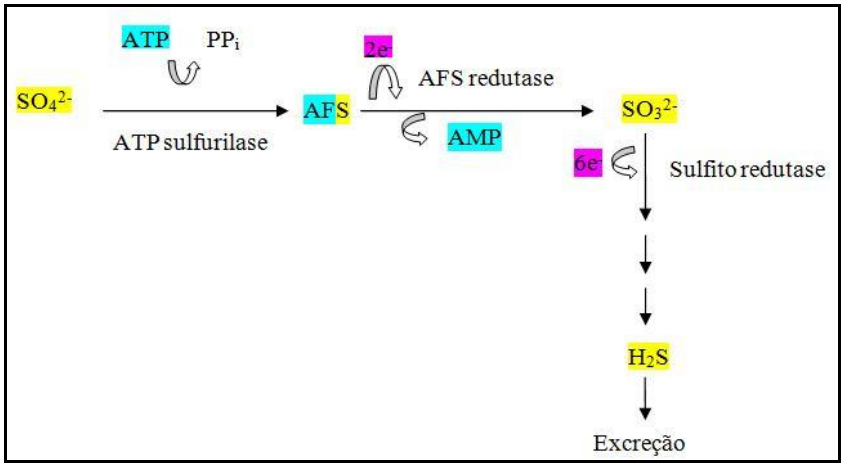
Os substratos energéticos amplamente utilizados pelas diversas espécies de BRS são H_2 (CO_2 como fonte de carbono), lactato e piruvato, enquanto que os demais compostos são de uso mais restrito (MADIGAN et al., 2010).

A redução dos íons sulfato pelas BRS ocorre através da via dissimilativa, sendo o produto final o sulfeto de hidrogênio, o qual pode estar presente sob três formas: H_2S (solúvel), HS^- e S^{2-}, dependendo do pH do meio uma das formas poderá predominar (STEFANIE et al., 1994). Esta redução do SO_4^{2-} a H_2S requer a transferência de oito elétrons, como mostra a Figura 5, e ocorre por meio de diversos estágios intermediários.

O sulfato é muito estável quimicamente, não podendo ser reduzido antes da sua ativação inicial, a qual é realizada através da molécula chamada adenosina trifosfato (ATP). A enzima ATP sulfurilase catalisa a ligação do íon sulfato a um fosfato do ATP, levando à formação de adenosina fosfosulfato (AFS). O sulfato presente na AFS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}) por meio da enzima AFS redutase, com liberação de adenosina monofosfato (AMP). Quando

formado o sulfito, a enzima sulfito redutase o converte em sulfeto de hidrogênio, o qual é excretado (MADIGAN et al., 2010).

Figura 5- Bioquímica da redução dissimilativa de sulfato



Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2010.

Durante o processo de redução dissimilativa do sulfato, as reações de transporte de elétrons através da membrana citoplasmática são realizadas por diversas proteínas visando tornar estes elétrons disponíveis às APS redutase e sulfito redutase. Estas reações levam ao estabelecimento de um estado energizado da membrana que é utilizada na geração de ATP, catalisada pela enzima ATPase (MADIGAN et al., 2010).

A enzima hidrogenase, presente em algumas espécies de BRS, tem uma função importante para a conservação de energia durante a redução do sulfato realizada pelas BRS, seja na presença de H_2 ou a partir de compostos orgânicos como lactato ou piruvato. Durante a oxidação do lactato a acetato, é formado H_2, que é permeável e difundi-se através da membrana citoplasmática. Este H_2 formado atravessa a membrana e é oxidado pelas hidrogenases localizadas na parte externa da membrana, dando início ao estabelecimento de uma força próton motiva (MADIGAN et al. 2010).

1.4.2.2 BRS e os casos de biocorrosão

As BRS são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de biocorrosão e causam preocupação devido ao grande número de casos de corrosão associados com este grupo. Estas bactérias podem acelerar a corrosão de metais, e os casos mais comuns são encontrados em ambientes marinhos.

O estudo da corrosão marinha de ligas de aço iniciou por volta de 60-70 anos atrás, porém poucos consideravam a participação dos micro-organismos na corrosão. Na década de 90 os pesquisadores começaram a dar mais atenção à influência de micro-organismos, como bactérias, na corrosão marinha do aço. As bactérias capazes de produzir sulfeto, tais como as BRS, foram consideradas as principais envolvidas no processo de corrosão do aço em ambientes marinhos. Desde então, muitos estudos têm sido realizados a fim de entender ao certo o processo de corrosão provocado por elas.

Em 1993, o comportamento eletroquímico de ligas de aço resistentes à corrosão foi avaliado na presença de BRS em água do mar. O estudo confirmou que o comportamento eletroquímico do metal na presença das bactérias foi afetado significativamente, sendo observada uma área de dissolução ativa do metal, o que contribuiu para a aceleração do processo corrosivo e favoreceu a formação de corrosão localizada por pites (GOUDA, SHALABY e BANAT, 1993).

Alguns anos depois González, Santana e Mirza-Rosca (1998) estudaram a influência de biofilmes de BRS na corrosão do aço em água do mar natural. Os resultados foram avaliados através de técnicas eletroquímicas e mostraram que o processo corrosivo foi acelerado na presença das BRS, confirmando a ação corrosiva destas bactérias.

Um estudo visando avaliar a superfície do aço após a adesão de biofilmes formados por BRS, em água do mar, foi realizado utilizando uma técnica microscópica, a microscopia de força atômica (MFA). Verificou-se que em apenas uma hora após o contato das BRS com o metal foi possível observar a adesão destas bactérias na superfície do aço e depois de 20 dias a presença de corrosão localizada por pites também foi observada. Estes resultados confirmaram a capacidade das BRS em aderir superfícies metálicas, formando biofilmes e consequentemente favorecendo o desenvolvimento da corrosão localiza (XU, CHAN e FANG, 2002).

O trabalho de Kuang et al., (2007) avaliou o efeito do desenvolvimento de BRS em água do mar sobre o comportamento do aço. Este estudo discutiu a alteração no comportamento de parâmetros como a concentração de sulfeto, valor de pH e o potencial de corrosão do sistema na presença das bactérias. Também mostraram que após 4 dias de ensaio as BRS atingiram seu valor máximo de crescimento e depois desse período a população bacteriana decresceu rapidamente. Assim, estes autores propuseram que a taxa média da corrosão do aço foi afetada principalmente pelo acúmulo de produtos metabólicos gerados pela atividade destes micro-organismos e não propriamente pelo número de células viáveis.

Em 2008, Castaneda e Benetton (2008) estudaram a influência do biofilme de BRS em sítios ativos de corrosão formados na interface aço/eletrólito, quando expostos a água do mar artificial e observaram uma aceleração significativa da corrosão do aço carbono no meio contendo BRS, com aumento das taxas de corrosão em quatro vezes quando comparado com o meio estéril.

Recentemente, o estudo de ALABBAS et al. (2013) para avaliar o processo de corrosão microbiológica por BRS em aço carbono de alta resistência, evidenciou que a atividade metabólica das bactérias na superfície do metal levou a formação de biofilme, além de camadas porosas de sulfeto de ferro, o que contribuiu para o surgimento de uma intensa corrosão localizada na superfície do aço.

Os estudos mencionados confirmam o envolvimento das BRS na corrosão do aço em água do mar, acelerando significativamente o processo de corrosão do metal, principalmente através do desenvolvimento de corrosão localizada por pites.

1.5 Mecanismos envolvidos na biocorrosão

Os micro-organismos induzem, aceleram ou mantêm a reação de corrosão em uma interface metal/solução condicionada por biofilmes ou depósitos metabólicos (*biofouling*). Os micro-organismos não alteram a natureza eletroquímica do fenômeno, porém intensificam o processo corrosivo através de diferentes mecanismos (VIDELA, 2003). Os principais

mecanismos envolvidos nos casos de biocorrosão são formação de ácidos, despolarização catódica, aeração diferencial e ação conjunta de bactérias, os quais serão apresentados a seguir.

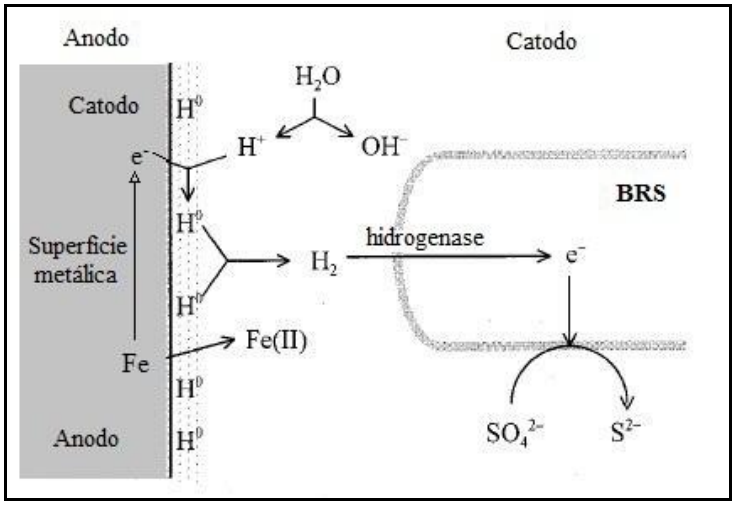
1.5.1 Formação de Ácidos

Como mencionado anteriormente, alguns micro-organismos, como fungos, algas e bactérias, são capazes de secretar metabólitos ácidos contribuindo para o processo de corrosão. A formação destes leva à ruptura de filmes protetores, destruindo a camada de passivação de materiais metálicos, diminuindo a resistência à transferência de carga e favorecendo a corrosão. O ácido metabolicamente produzido altera o pH do meio, causando predominantemente uma corrosão generalizada (GONÇALVES, 2002).

1.5.2 Despolarização Catódica

Em 1934, Von Wolzogen Kuhr e Van der Vlugt forneceram uma evidência significativa para explicar a corrosão causada pela atividade das BRS. Esta evidência ficou conhecida como *Teoria da Despolarização Catódica ou Teoria Clássica*, sendo considerada como a primeira interpretação eletroquímica de um caso de biocorrosão citada na literatura (JAVAHERDASHTI, 2010). De acordo com esta teoria, as BRS consomem o hidrogênio da área catódica através da enzima hidrogenase, ocasionando assim a despolarização da área em questão, acelerando a corrosão, conforme mostra a Figura 6 (GENTIL, 2011).

Figura 6- Esquema da despolarização catódica



Fonte: Adaptado de Potekhina et al., 1999.

O hidrogênio atômico (H^o) formado através da dissociação da água presente no meio se adsorve na superfície do metal, polarizando-a catodicamente reduzindo a velocidade do processo corrosivo, pois evita que os átomos de hidrogênio se recombinem na área catódica. Porém, na presença de BRS o processo corrosivo é acelerado devido à despolarização do catodo, já que estas bactérias utilizam o hidrogênio atômico da área catódica através da enzima hidrogenase para a redução dos íons sulfato a sulfeto (PAULA, 2010).

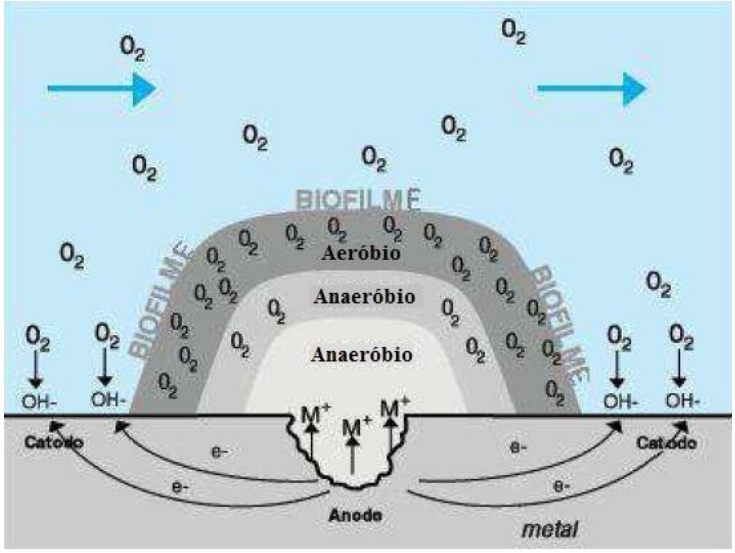
Atualmente, a teoria da despolarização catódica é questionada, pois não leva em consideração o efeito corrosivo dos produtos da corrosão, como óxidos, sulfetos, hidróxidos e até mesmo dos biofilmes. Além disso, esta teoria considera a corrosão apenas por espécies que possuem a enzima hidrogenase, excluindo a participação dos demais micro-organismos envolvidos na biocorrosão (VIDELA e HERRERA, 2005).

1.5.3 Aeração diferencial

A corrosão causada pelo processo de aeração diferencial ocorre quando um material metálico é exposto a regiões diferentemente aeradas. Assim, superfícies recobertas por biofilmes

de forma não uniforme serão expostas a diferentes concentrações de oxigênio, acarretando a criação de células de aeração diferencial, conforme ilustrado na Figura 7 (VIDELA, 2003). A complexidade das populações microbianas e a presença de SPE nos biofilmes são fatores que evitam a difusão do oxigênio, estabelecendo uma condição de anaerobiose na base do biofilme (região anódica), favorecendo este tipo de corrosão (GALVÃO, 2008).

Figura 7- Biocorrosão por aeração diferencial



Fonte: Borenstein, 1994.

1.5.4 Inativação dos inibidores de corrosão

Os micro-organismos também podem interferir no processo corrosivo através da inativação dos inibidores utilizados para evitar a corrosão. Isto pode ocorrer de duas maneiras: através da formação de biofilmes, que atua como uma barreira de transporte, impedindo a penetração dos inibidores de corrosão e diminuindo assim a área de contato do inibidor com a superfície do metal; ou através do uso dos inibidores como nutrientes (fontes de carbono ou nitrogênio, por exemplo) pelos micro-organismos. Por exemplo, bactérias nitrificantes podem metabolizar nitrito de sódio, que é um inibidor de corrosão muito utilizado em sistemas de água de arrefecimento. Estas bactérias convertem nitrito de sódio em nitrato de sódio que, por sua vez,

não possui as propriedades inibidoras à corrosão apresentadas pelo nitrito (ZARASVAND e RAI, 2013).

1.6 Monitoramento da biocorrosão

Devido às variáveis de natureza diferentes envolvidas nos casos de biocorrosão, um efetivo monitoramento do sistema deve necessariamente fornecer informações sobre o ataque corrosivo, a qualidade da água, as populações bacterianas planctônicas e sésseis, as características dos biofilmes, e a composição química e biológica dos depósitos inorgânicos presentes sobre o material (VIDELA E HERRERA, 2005). Assim, é necessário o uso de várias técnicas diferentes para estudar o processo de corrosão causado pela atividade microbiana nas superfícies (BEECH, 2004). Dentre os principais métodos utilizados para monitorar a biocorrosão estão os métodos microbiológicos, físico-químicos, microscópicos e eletroquímicos e estes serão descritos a seguir.

1.6.1 Métodos microbiológicos

O acompanhamento ou monitoramento da biocorrosão deve ser realizado pelo uso de dispositivos incorporados ao sistema que permitam a avaliação da população microbiana planctônica e séssil presente. É preciso identificar e enumerar os micro-organismos causadores da corrosão. A contagem de bactérias aeróbias totais, bactérias anaeróbias totais e fungos podem indicar níveis importantes de micro-organismos agressivos ao material. Essa contagem pode ser feita através de técnicas tradicionais de crescimento em meios de cultura gerais ou seletivos, sendo a técnica *pourplate* em placas de Petri normalmente utilizada para bactérias aeróbias e fungos e o método do número mais provável (NMP) no caso de bactérias anaeróbias, incluindo as BRS (VIDELA, 2003).

O método do NMP permite estimar a concentração de micro-organismos viáveis em uma amostra ao analisar o crescimento celular em um meio de cultura líquido, através da turvação do meio ou pela formação de produtos metabólicos. Neste método são realizadas diluições

sucessivas do inóculo no meio de cultura, seguida por incubação das amostras por determinado período de tempo, que são 28 dias para bactérias anaeróbias. Após o período de incubação as amostras que apresentam crescimento celular, verificada pela turvação do meio, são consideradas positivas. Os resultados positivos e negativos são combinados para estimar o número mais provável de micro-organismos viáveis presentes na amostra. A estimativa do resultado é feita com base em tabelas estatísticas e na teoria da probabilidade (HARRIS, JONES e LEWIS, 1998; SUTTON, 2010).

1.6.2 Métodos físico-químicos

Segundo Galvão (2008), a determinação de variáveis físico-químicas tais como, teor de oxigênio, sulfeto, cloreto, pH, temperatura, são importantes para o monitoramento da água ou solo em que se encontra o material metálico, já que estes parâmetros influenciam diretamente o metabolismo dos micro-organismos e assim o processo corrosivo.

1.6.3 Métodos de avaliação qualitativo e semi-quantitativo da CMI

Além dos métodos de monitoramento microbiológico, também se faz necessário o uso de métodos que permitam visualizar o ataque corrosivo ou a presença de biofilmes na superfície do substrato metálico, bem como obter informações sobre os produtos de corrosão formados (PAULA, 2010). Uma das técnicas muito utilizadas para avaliar qualitativamente a deterioração do metal é a microscopia.

A microscopia fornece informações sobre a morfologia das células microbianas e colônias, a distribuição microbiana das colônias na superfície, a presença de SPE e a natureza dos produtos de corrosão (cristalino ou amorfo). Também revela o tipo de ataque corrosivo, evidenciado por alterações da microestrutura do metal após a remoção do biofilme. Dentre as técnicas microscópicas mais utilizadas estão a microscopia eletrônica de varredura (MEV),

microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA), microscopia confocal por varredura a laser (MCVL) e microscopia de força atômica (MFA) (BEECH, 2004).

A microscopia eletrônica de varredura é uma das técnicas mais versáteis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. Sua principal vantagem é a alta resolução em que a imagem pode ser obtida ao analisar as amostras. Valores de resolução da ordem de 2 a 5 nm são geralmente apresentados por microscópios eletrônicos de varredura comerciais, enquanto que os de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução menor que 1 nm (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007). Esta técnica fornece informações da matriz cristalina, composição química, estrutura magnética e até mesmo do potencial elétrico da espécie sob observação (HERRERA e VIDELA, 2009).

O material biológico em biofilmes microbianos exige uma adequada manipulação da amostra para evitar a destruição da estrutura celular dos micro-organismos durante a análise de MEV, que opera a alto vácuo. Amostras não condutoras devem ser revestidas com um filme de metal antes de serem submetidas à análise, para evitar o acúmulo de elétrons que impeçam a formação de imagens limpas. A microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA), que não opera em alto vácuo, pode fornecer imagens rápidas de biofilmes sem necessitar de muito preparo da amostra para a análise. Esta técnica trabalha em altas pressões e permite observar espécies biológicas mesmo sem estarem revestidas previamente por uma camada de metal (HERRERA e VIDELA, 2009).

Já a análise química da superfície permite a determinação dos produtos de corrosão e dos depósitos microbiológicos formados. Técnicas como espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e difração de raios X (DRX) são muito utilizadas com este propósito.

A técnica de EDS fornece uma análise elementar semi-quantitativa do produto de corrosão superficial, permitindo obter a composição da amostra a partir da relação entre a intensidade de raios-X da amostra em questão com um padrão apropriado. Esta técnica pode ser aplicada a um microscópio eletrônico de varredura, permitindo simultaneamente a observação e a determinação semi-quantitativa de locais selecionados na superfície do metal (BEECH, 2004; HERRERA E VIDELA, 2009).

A técnica de DRX permite determinar a espécie química do produto de corrosão formado. Esta técnica identifica os compostos através da sua estrutura cristalina pelo fenômeno físico da difração. (HERRERA E VIDELA, 2009).

1.6.4 Métodos eletroquímicos

Apesar da participação ativa dos micro-organismos no fenômeno, a biocorrosão é por natureza um processo eletroquímico. Devido a isso, as técnicas eletroquímicas para a avaliação da corrosão são muito importantes no estudo e acompanhamento da biocorrosão, tanto em laboratório como em campo (VIDELA, 2003).

Os métodos eletroquímicos utilizados nessa dissertação foram espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e polarização potenciodinâmica, que serão descritos a seguir.

1.6.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de EIE permite avaliar como um sistema se comporta frente a processos correlacionados ocorrendo em velocidades distintas. Esta técnica fornece informações detalhadas sobre as características elétricas da interface metal/solução (CARVALHO e ANDRADE, 2006).

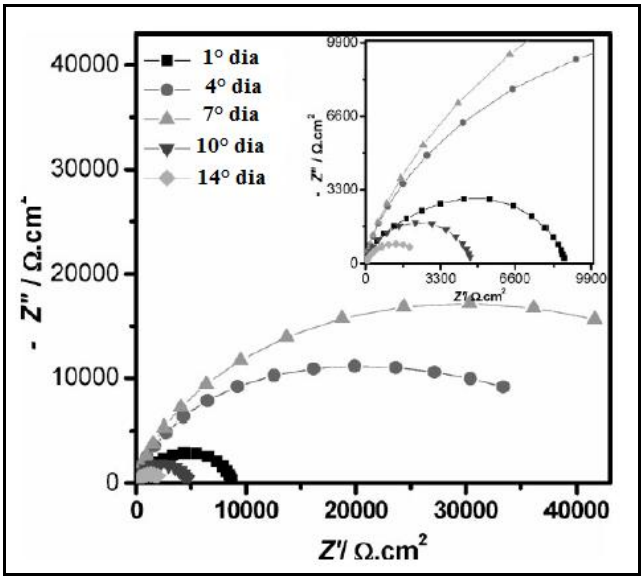
A EIE baseia-se na perturbação do processo eletroquímico, através da aplicação de pequenos sinais senoidais do potencial ou da corrente aplicada, em função de uma determinada faixa de frequência desejada (GRUNDMEIER, SCHMIDT e STRATMANN, 1999; CARVALHO, 2004). Como resposta ao sistema, pode-se obter dados importantes sobre a cinética de transferência de carga e também sobre a estrutura e propriedades da interface eletrodo/eletrólito (GNEDENKOV, SINEBRYUKHOV, e SERGIENKO, 2005).

Um ponto importante da EIE é o fato desta ser uma técnica de estado estacionário, ou seja, durante a análise da resposta frente a uma dada perturbação de baixa amplitude o sinal amostrado em um dado valor da frequência é estável com o tempo, o que permite estudar diferentes fenômenos da interface caracterizados por constantes de tempo distintas. Com a condição de estado estacionário pode-se obter uma alta precisão nos dados de impedância (SILVA, 2013). As medidas de EIE podem ser obtidas utilizando-se um potenciostato acoplado a um computador. A aplicação da corrente alternada, em uma determinada frequência, à célula eletroquímica é programada pelo computador e aplicada ao eletrodo de trabalho pelo

potenciostato. A resposta é recebida pelo detector de frequência, que transfere os dados ao computador para processamento (WOLYNEC, 2003).

Os resultados obtidos a partir da EIE são utilizados para a construção de diagramas que representam o comportamento da superfície em um determinado processo eletroquímico. Dentre as formas de representação para os dados de EIE estão o diagrama de Nyquist (Figura 8), também chamada de representação de Argand ou Cole-Cole. Neste caso, os valores da impedância real (Z') e da impedância imaginária (-Z") são representados em um plano complexo. A impedância real (Z') incorpora as resistências ôhmicas, isto é, a resistência pura, que independe da frequência. Já a impedância imaginária (Z") incorpora as reatâncias, ou seja, a resistência que é dependente da frequência aplicada ao sistema. Os pontos que correspondem aos baixos valores de frequência estão ao lado direito do diagrama. Conforme a frequência aumenta os pontos se deslocam para a esquerda, passando pelo ponto de frequência máxima ($f_{máx}$) (WOLYNEC, 2003; SILVA, 2013). Na Figura 8 está representado um diagrama de Nyquist para um processo de corrosão do aço carbono na presença de BRS.

Figura 8- Exemplo de diagrama de Nyquist para um processo de corrosão em aço carbono por BRS

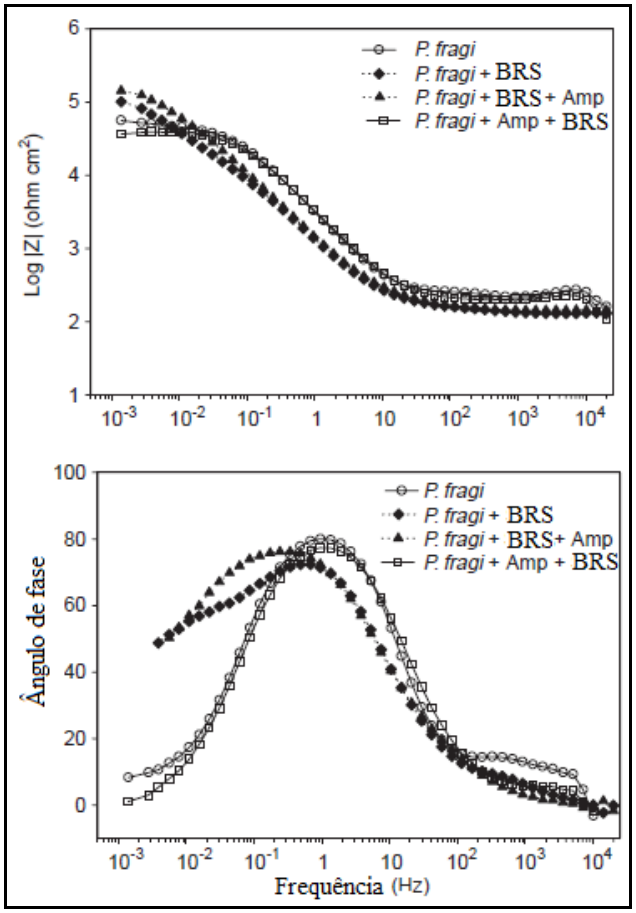


Fonte: Fan, Liu e Dong, 2013.

Outra forma de representar os resultados obtidos a partir da técnica de impedância é através dos diagramas de Bode e fase, ilustrados na Figura 9. Estes apresentam a vantagem de exibir as variações da impedância em altas frequências, geralmente omitidas na representação de Nyquist. No diagrama de Bode são apresentados os dados do módulo de impedância (|Z|) em escala logarítmica em função dos valores de frequência, também em escala logarítmica. Já no diagrama de fase são plotados os dados de ângulo de fase em função da frequência em escala logarítmica. Os diagramas de Bode e fase também podem ser representados juntos (CANO, LAFUENTE e BASTIDAS, 2009; WOLYNEC, 2003).

A Figura 9 apresenta os diagramas de Bode e fase para um processo em que um antibiótico, ampicilina (Amp), foi aplicado no tratamento de biofilmes formados por *Pseudomonas fragi* e BRS.

Figura 9- Exemplos de diagramas de Bode e fase para um processo de tratamento de biofilmes formados por *P. fragi* e BRS, empregando um antibiótico (Amp)

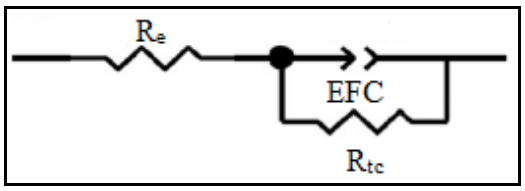


Fonte: Jayaraman et al., 1999.

Na técnica de EIE é importante conhecer as reações que ocorrem na interface eletroquímica, pois estas fornecem informações sobre a cinética das reações do eletrodo, a natureza da interface, e também sobre os efeitos de transporte de massa. Para tentar representar a interface metal/eletrólito são utilizados modelos de circuitos elétricos equivalentes (CARVALHO e ANDRADE, 2006). Os circuitos equivalentes reproduzem as propriedades elétricas do sistema, baseado em um possível modelo físico, onde cada elemento representa e caracteriza as propriedades eletroquímicas do processo (GNEDENKOV, SINEBRYUKHOV, e SERGIENKO, 2005).

Existem muitos modelos de circuitos para descrever o comportamento da interface metal/eletrólito e estes variam de acordo com o tipo de processo eletroquímico envolvido, sendo função do analista interpretar o modelo físico atribuído a um determinado circuito elétrico proposto (CARVALHO e ANDRADE, 2006). Os modelos de circuitos que contêm o menor número de parâmetros ajustados são os mais significativos, pois a adição de muitos elementos ao modelo pode levar a obtenção de resultados satisfatórios no ajuste, porém sem apresentar uma relação coerente com os processos físico-químicos inerentes ao sistema (SILVA, 2013). A Figura 10 ilustra um modelo de circuito equivalente simples, onde R_{tc} representa a relação entre corrente e potencial relacionada aos processos de transferência de carga, EFC representa o elemento de fase constante associada à dupla camada elétrica e R_e corresponde à resistência do eletrólito (ALABBAS et al., 2013). O elemento de fase constante (EFC) normalmente é utilizado no circuito elétrico, em substituição ao capacitor ideal, quando a superfície do eletrodo apresenta rugosidade e heterogeneidades que resultam em uma distribuição não uniforme da frequência sobre a superfície (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, MCNEIL e RAWSON, 2005; SILVA, 2013).

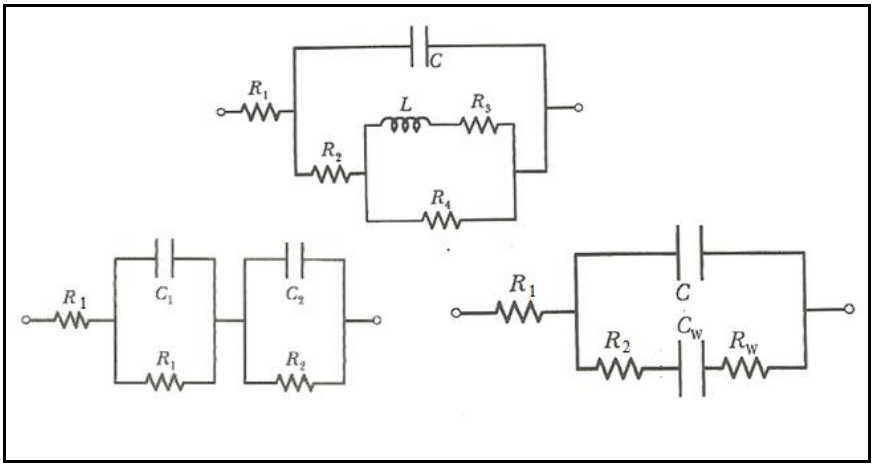
Figura 10- Exemplo de um modelo simples de circuito elétrico utilizado para simular dados de EIE. R_e – resistência do eletrólito; EFC – elemento de fase constante; R_{tc} – Resistência à transferência de carga



Fonte: Alabbas et al., 2013.

Na prática, nem todos os sistemas eletroquímicos podem ser representados pelo modelo de circuito simples representado na Figura 10. Um circuito equivalente pode conter além de resistores e capacitores, também indutores (bobinas). A Figura 11 ilustra exemplos de outros tipos de circuitos (WOLYNEC, 2003).

Figura 11- Exemplo de tipos de circuitos elétricos usados na simulação dos dados de EIE. R_1, R_2, R_3 e R_4 – resistências; C, C_1, C_2 – capacitores; L – bobina; R_w e Cw– pseudoresistor e pseudocapacitor, respectivamente, associados com transportes de massa



Fonte: Adaptado de Wolynec, 2003.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica tem sido utilizada para estudar diversos processos, desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até estudos de processos cinéticos eletroquímicos variados, tais como, processos eletrocatalíticos, células fotovoltaicas e sistemas de corrosão (CARVALHO e ANDRADE, 2006). Dentre os processos de corrosão, a EIE é bastante utilizada também para avaliar a corrosão microbiológica. Segundo Kim et al. (2011) esta técnica é adequada para o monitoramento de biofilmes, pois as pequenas perturbações impostas ao sistema têm pouco ou nenhum efeito sobre as bactérias.

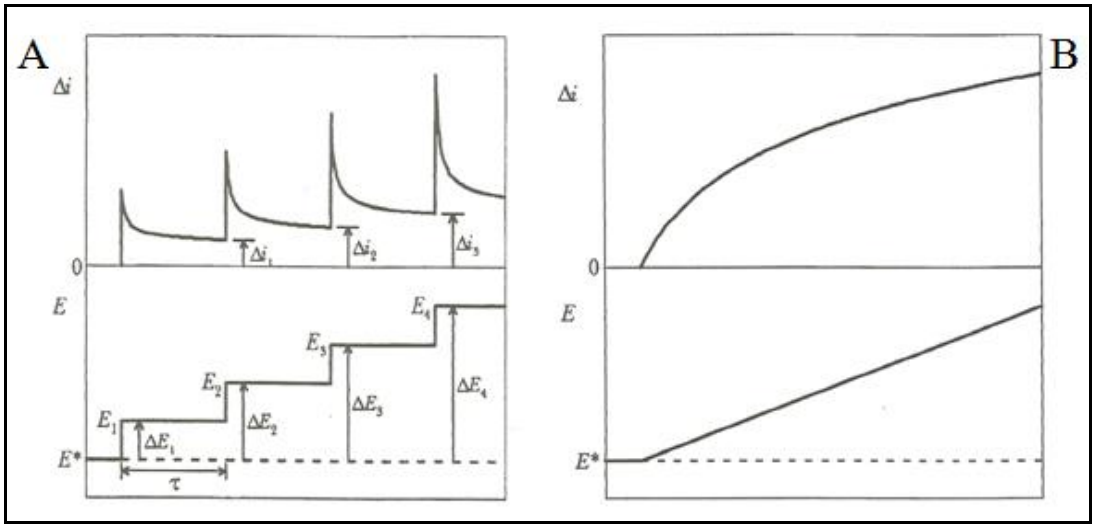
1.6.4.2 Polarização potenciodinâmica

A polarização ocorre quando se impõe a um metal um potencial de eletrodo diferente do potencial de corrosão (ou de equilíbrio). O conhecimento do comportamento eletroquímico do metal polarizado apresenta interesse prático e teórico, pois permite simular condições semelhantes às que o metal se encontra no ambiente (atmosfera, indústria, água do mar, entre outros), quando o distanciamento do seu potencial de corrosão leva a alterações importantes em sua superfície (WOLYNEC, 2003; PAULA, 2010).

As curvas de polarização são obtidas através de um potenciostato, o qual permite impor ao eletrodo o potencial desejado frente ao eletrodo de referência, e também medir a corrente de polarização, registrando-a em função do potencial. O potenciostato conduz o levantamento de curvas de polarização que representam o efeito global de todas as reações que ocorrem sobre o eletrodo e não apenas de uma única reação (WOLYNEC, 2003).

Existem dois métodos convencionais que podem ser utilizados para a obtenção das curvas de polarização: o método potenciostático e o método potenciodinâmico, cuja representação encontra-se na Figura 12. No método potenciostático são aplicados valores discretos, crescentes ou decrescentes de potencial, ao potencial de eletrodo (Figura 12 A), medindo a corrente resultante após o sistema atingir a nova condição de estado estacionário. Já no método potenciodinâmico (Figura 12 B), varia-se de forma contínua o potencial de eletrodo, registrando a variação da corrente que também ocorre continuamente (WOLYNEC, 2003).

Figura 12- Representação esquemática dos métodos potenciostático (A) e potenciodinâmico (B) para obtenção das curvas de polarização. Δi - variação da corrente; E - potencial de eletrodo



Fonte: Adaptado de Wolynec, 2003.

A apresentação das curvas de polarização se dá pela relação, estabelecida por Tafel, entre a sobretensão de um eletrodo e a densidade de corrente correspondente. A relação de Tafel é expressa pela equação 1:

$$\eta = a \pm b \log i \quad (1)$$

Onde:

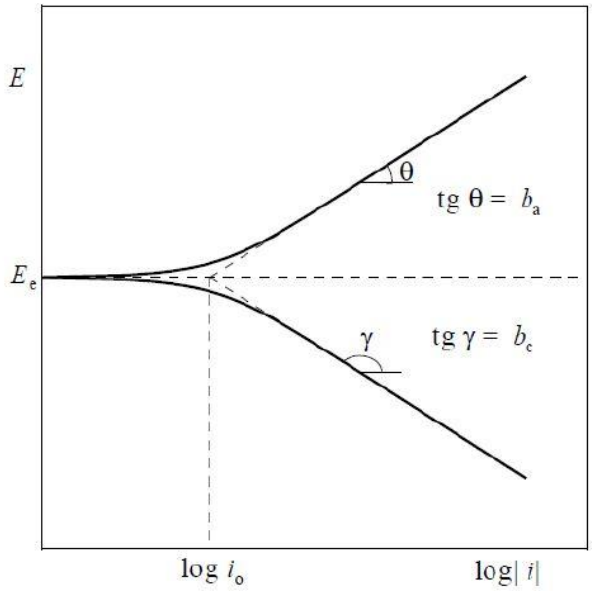
η – sobretensão ou sobrepotencial ($\eta = E - E_e$)

a e b – constantes de Tafel

i – densidade de corrente

Como a equação de Tafel é de natureza logarítmica, uma das formas mais apropriadas de se representar as curvas de polarização é através de um diagrama potencial contra a densidade de corrente em escala logarítmica (E *vs* log (i)). A vantagem em se utilizar este tipo de diagrama se deve ao fato que a parte das curvas em que a equação de Tafel é válida é reta (WOLYNEC, 2003). A Figura 13 representa as curvas de polarização através de um diagrama monologarítmico.

Figura 13- Representação das curvas de polarização em um diagrama monologarítmico. E- potencial de eletrodo; E_e – potencial de equilíbrio; θ - inclinação da reta anódica; γ - inclinação da reta catódica; i- densidade de corrente; b_a e b_c – constantes de Tafel anódica e catódica, respectivamente



Fonte: Wolynec, 2003

A partir da variação do potencial de eletrodo aplicado, o valor da sobretensão descreve o comportamento do metal. Para valores de sobretensão positivos, a corrente que passa pela interface metal/eletrólito é positiva (corrente anódica) e o metal sofrerá corrosão através de uma reação de oxidação. Caso a sobretensão apresente valores negativos, será estabelecida uma corrente negativa, ou seja, catódica, levando a uma reação de redução (GENTIL, 2011).

1.7 Métodos de prevenção e controle da biocorrosão

O uso de métodos de prevenção e controle se faz necessário para tentar evitar ou amenizar os efeitos da atividade microbiana sobre metais e ligas metálicas. Para definir o melhor método para prevenir e controlar a biocorrosão em um sistema industrial é importante compreender todas

as condições operacionais do sistema, assim a avaliação de todos os parâmetros envolvidos no processo corrosivo é essencial para a obtenção de um tratamento eficiente (VIDELA, 2002).

Os métodos empregados para controlar a biocorrosão devem considerar duas questões fundamentais (VIDELA, 2003):

- a inibição do crescimento e atividade metabólica dos micro-organismos; e

- a alteração das características do ambiente em que o processo de corrosão está presente, evitando a adaptação dos micro-organismos às condições existentes.

Dentre os métodos utilizados no controle e prevenção da biocorrosão estão os procedimentos de limpeza, uso de revestimentos orgânicos, proteção catódica e tratamentos químicos (biocidas) (VIDELA, 2002).

1.7.1 Procedimentos de limpeza

A limpeza do sistema tem como objetivo a remoção de depósitos tais como incrustações e/ou sedimentos viscosos da superfície metálica. Os procedimentos de limpeza podem ser mecânicos ou químicos.

A limpeza mecânica consiste em qualquer método capaz de remover fisicamente os depósitos formados sobre a superfície, evitando o surgimento de corrosão localizada por baixo dos depósitos e o desenvolvimento de células de aeração diferencial (VIDELA, 2002). Estão incluídos os métodos de escovação, jatos d'água de alta pressão, raspagem, jateamento de areia, e uso de *pigs* (do inglês *pipeline inspection gauge*; em português, dispositivo para inspeção de dutos) (VIDELA, 2002). *Pigs* são instrumentos que permitem a limpeza e inspeção de tubulações internamente (JAVAHERDASHIT, 2010). O *pig* remove depósitos orgânicos, incrustações e qualquer outro material aderido às paredes internas da tubulação (GALVÃO, 2008).

A limpeza química, normalmente é aplicada após a limpeza mecânica, sendo bastante eficiente em espaços fechados e de difícil acesso, assim como em regiões de ataque localizado. Neste tipo de limpeza podem ser utilizados ácidos minerais, orgânicos e substâncias quelantes (compostos orgânicos e inorgânicos capazes de formar complexos com íons metálicos) (VIDELA, 2003).

1.7.2 Revestimentos

O uso de revestimentos como um método de proteção contra a biocorrosão baseia-se na aplicação de produtos não tóxicos, tais como silicone, resina epóxi e compostos fluorados. Para estruturas imersas na água do mar, a utilização de pinturas *antifouling* é necessária. Revestimentos também são aplicados quando o uso de biocidas não é possível (em sistemas abertos, por exemplo) (VIDELA, 2002). Para oferecer uma boa proteção anticorrosiva, os revestimentos não devem apresentar alterações devido ao ataque microbiano e nem sofrer processos de degradação, o que poderia levar à produção de compostos corrosivos (VIDELA, 2003).

Em geral, os revestimentos constituem um bom método de proteção, pois reduzem a tensão superficial do substrato (superfície metálica), dificultando a aderência dos micro-organismos. Porém, devem ser aplicadas de forma contínua, pois do contrário, imperfeições na película poderiam favorecer a formação de sítios preferenciais, gerando um ataque localizado (VIDELA, 2003).

1.7.3 Proteção catódica

Proteção catódica é uma técnica bastante utilizada no mundo inteiro para controlar a corrosão de estruturas enterradas ou submersas. Com esta técnica é possível manter as estruturas livres de um processo corrosivo por tempo indeterminado. A grande vantagem da proteção catódica é permitir o controle da corrosão em instalações que, por estarem enterradas ou submersas não poderiam ser vistoriadas ou revestidas continuamente.

A proteção catódica consiste em eliminar artificialmente as áreas anódicas da superfície metálica, de forma que toda a estrutura adquira comportamento catódico. Desse modo, a corrente elétrica entre o anodo e catodo desaparece e o processo corrosivo é evitado (GENTIL, 2011).

Entre outras alterações, a proteção catódica ocasiona um aumento do pH na interface entre o metal e o eletrólito devido à redução dos íons H^+ da água e à consequente formação de íons

hidroxila. Isso diminui a solubilidade dos compostos cálcio e magnésio e favorece a precipitação de depósitos calcários. Estes depósitos podem formar uma barreira protetora, reduzindo a densidade de corrente necessária para manter um determinado potencial, e consequentemente, diminuindo os custos necessários para a aplicação da proteção catódica (EDYVEAN, 1992; GUEZENNEC, 1994).

Esta técnica pode ser realizada através do método galvânico ou por corrente impressa. No primeiro caso, também chamado de proteção catódica por anodos de sacrifício, o fluxo de corrente elétrica necessária para o processo origina-se da diferença de potencial entre o metal que se quer proteger e outro metal, que age como anodo de sacrifício. É necessário que o anodo escolhido possua um potencial mais negativo, de acordo com a tabela de potenciais da série galvânica, que o material que se deseja proteger.

Já na proteção catódica por corrente impressa, o fluxo de corrente é originado a partir da força eletromotriz de uma fonte externa, que gera uma corrente elétrica contínua. Nesse caso, para realizar a dispersão da corrente elétrica, são utilizados anodos especiais inertes, com características e aplicações que dependem do eletrólito onde são empregados (GENTIL, 2011).

A aplicação da proteção catódica no controle da biocorrosão pode ser baseada, entre outros fatores, na alteração da natureza química do ambiente devido ao aumento do pH, conforme explicado anteriormente, inibindo ou reduzindo a reprodução bacteriana. Outra razão para a inibição bacteriana pode ser explicada pela teoria da repulsão eletrostática. Como a superfície metálica protegida por proteção catódica é carregada negativamente, as bactérias são repelidas, já que estas também possuem cargas negativas, e assim a adesão bacteriana é evitada (JAVAHERDASHTI, 2010).

1.7.4 Biocidas

O tratamento químico mais utilizado no controle e prevenção da biocorrosão é o tratamento com biocidas (VIDELA, 2003), os quais são utilizados para prevenir, inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998). Os biocidas capazes de matar os micro-organismos (no presente caso, as bactérias) são chamados

bactericidas; já os que apenas inibem o crescimento microbiano são denominados bacteriostáticos (MADIGAN et al., 2010).

Os critérios convencionais que se aplicam para a seleção de um biocida efetivo incluem: (1) eficácia comprovada contra uma grande variedade de micro-organismos; (2) capacidade de penetrar e dispersar o biofilme microbiano; (3) compatibilidade química e física com outros produtos (inibidores de corrosão, por exemplo) e com o ambiente (por exemplo, os efeitos do pH); (4) segurança durante o manuseio e armazenamento; (5) adequada biodegradabilidade; (6) baixo custo (GUIAMET e SARAVIA, 2005).

Além destes critérios, o conhecimento dos diferentes tipos de micro-organismos presentes no sistema que se deseja tratar também é fundamental (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998). Os fatores mais importantes são a concentração do biocida a ser utilizada e o tempo de contato com o sistema, os quais quando selecionados de forma arbitrária podem levar a resultados ineficazes no controle microbiano (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998). Segundo Morton et al.(1998), fatores como temperatura e pH do meio e a presença de matéria orgânica, também afetam a atividade de um biocida.

O tratamento com o uso de biocidas deve ser efetivo no controle dos micro-organismos planctônicos e, principalmente, nos micro-organismos sésseis, já que estes são os principais envolvidos nos casos de biocorrosão. No entanto, a ação de biocidas no controle dos micro-organismos sésseis ainda é limitada, devido aos mecanismos de defesa naturais da população microbiana aderida às superfícies. Isso significa que embora os biocidas geralmente utilizados sejam capazes de destruir as células dos micro-organismos planctônicos, sua ação contra os micro-organismos sésseis é mais difícil, pois estes são protegidos por uma camada de polissacarídeos (LAVANIA et al., 2011).

Ao contrário dos antibióticos que afetam um processo fisiológico específico, os biocidas possuem mais de uma ação no controle dos micro-organismos. O mecanismo de ação de um biocida pode ser definido de acordo com a estrutura microbiana que se deseja eliminar e três níveis podem ser descritos: interação do biocida com a parede celular, interação com a membrana citoplasmática e interação com os componentes citoplasmáticos (ácidos nucléicos, ribossomos, entre outros). Porém, é possível que um biocida atue em um ou nos três níveis de interação com as células bacterianas para exercer a sua atividade antimicrobiana.

A aplicação dos biocidas pode ser realizada por duas maneiras: adição contínua de pequenas quantidades ou adição periódica de grandes quantidades, também chamado de tratamento de choque ou batelada. Este último caso permite a eliminação rápida de células presentes e também a redução do aparecimento de formas resistentes. O tratamento por choque é mais eficiente quando se faz a aplicação alternada de biocidas diferentes ou pelo uso de dois ou mais biocidas combinados. Neste caso, é importante que os compostos utilizados em conjunto não tenham ações antagônicas (GENTIL, 2011; GONÇALVES, 2002).

De acordo com Maxwell (2005), a única forma de prevenir completamente a colonização de bactérias em uma superfície é através da aplicação constante de biocida, ou seja, através do tratamento contínuo. Porém esta forma de tratamento nem sempre é possível, pois os custos para a aplicação do biocida de forma contínua podem exceder o custo para a substituição do sistema a ser protegido.

1.7.4.1 Principais biocidas empregados no controle da biocorrosão

Os biocidas podem ser classificados em oxidantes e não oxidantes. Os biocidas oxidantes apresentam altas velocidades de eliminação e agem através de reações para oxidar material orgânico. Já os não oxidantes, geralmente são mais eficientes por serem mais persistentes, apresentando controle sobre bactérias, fungos e algas. Estes reagem covalentemente com nucleófilos celulares, inativando as enzimas. Normalmente uma associação de biocidas oxidantes e não oxidantes é utilizada para uma melhor otimização do controle microbiano (CHAPMAN, 2003; VIDELA, 2002). A seguir, serão apresentados alguns dos principais biocidas utilizados para controlar a biocorrosão, bem como exemplos de sua atuação.

1.7.4.1.1 Biocidas oxidantes

Dentre estes biocidas os mais utilizados são cloro e seus derivados, ozônio, peróxido de hidrogênio, entre outros.

O cloro é utilizado principalmente na forma gasosa, que se hidrolisa em meio aquoso para formar ácido hipocloroso e ácido clorídrico. Este biocida é frequentemente empregado no tratamento de águas de torres de refrigeração, nas indústrias de papel e celulose, e como desinfetante nas indústrias de saúde e alimentos (CHAPMAN, 2003; VIDELA, 2002).

O ozônio oferece muitas vantagens em relação aos outros biocidas oxidantes. Possui alto poder oxidativo, sendo bastante eficiente contra a maioria das bactérias encontradas em sistemas industriais, incluindo também as células sésseis presentes em biofilmes. Esse biocida apresenta uma baixa concentração residual de produto e possui baixo grau de agressividade para as estruturas metálicas (VIDELA, 2002).

O composto peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é estável e relativamente econômico, além de ser eficaz contra uma ampla gama de bactérias, inclusive muitos micro-organismos que se tornaram resistentes a produtos à base de cloro (CLOETE, JACOBS E BROZEL, 1998).

1.7.4.1.2 Biocidas não oxidantes

Este grupo é composto por muitos compostos químicos, como formaldeído, compostos de amônio quartenários, isotiazolonas, sulfato fosfônio de tetraquishidroximetil (THPS), glutaraldeído, entre outros. Os biocidas não oxidantes são, geralmente, mais utilizados no controle da biocorrosão causada por BRS do que os biocidas oxidantes.

Formaldeído

Este biocida apresenta atividade em uma ampla faixa de pH, e é eficaz contra a produção de esporos. Possui polaridade elevada e alta reatividade nucleofílica, reagindo com grupos amino

primários livres, aminas, sulfetos, purinas e pirimidinas. O formaldeído causa danos às propriedades de transporte de componentes da membrana, diminuindo a síntese de enzimas (CLOETE, JACOBS E BROZEL, 1998).

O formaldeído foi utilizado no controle de biofilmes formados por BRS em aço carbono. A concentração empregada foi de 100 mg/L e o tratamento realizado por 90 dias visava avaliar a ação do biocida sobre células planctônicas e sésseis. Os resultados mostraram baixa eficiência do formaldeído, com redução de apenas uma ordem de grandeza para as células planctônicas e para as células sésseis não houve redução significativa (LAVANIA et al., 2011).

Compostos de amônio quartenários

Pertencem a uma classe de compostos catiônicos utilizados como biocidas e inibidores de corrosão. Estes compostos agem sobre as células dos micro-organismos dissolvendo os lipídeos, levando a perda do material celular vital. Também fornecem proteção contra a formação de SPE produzido durante a colonização dos micro-organismos (VIDELA, 2003). Algumas desvantagens no uso deste biocida são relacionadas à perda de sua eficiência em sistemas com teores elevados de matéria orgânica e a uma diminuição na sua atividade em altas temperaturas (GONÇALVES, 2002).

Badawi et al. (2010), sintetizaram e caracterizaram uma série de compostos de amônio quaternários e avaliaram sua eficácia na inibição da corrosão do aço carbono em HCl 1 mol L^{-1} e também na inibição do crescimento de BRS. O estudo foi realizado através de técnicas eletroquímicas de polarização potenciodinâmica, microscopia eletrônica de varredura e contagem das bactérias por diluição em série. A concentração testada para a inibição da corrosão no aço e do crescimento de BRS variou entre 1×10^{-5}e 1×10^{-2} mol L-1. Os resultados mostraram que os compostos hidróxidos de decil, dodecil e hexa decil dimetil isopropil amônio, possuem ação de inibição contra a corrosão em aço carbono e também inibem o crescimento de BRS, e sua atividade biocida depende da estrutura química do composto e o tamanho da cadeia hidrofóbica.

Isotiazolonas

São compostos que possuem enxofre, nitrogênio e oxigênio em sua formulação e agem a partir do ataque a grupos sulfidrilas de células microbianas, inibindo o crescimento celular (GONÇALVES, 2002). Apresentam a vantagem de serem eficazes em uma ampla faixa de pH e são compatíveis com outros produtos químicos utilizados no tratamento de água. Uma desvantagem é que não são compatíveis com ácido sulfídrico (H_2S). Isso limita o seu uso em sistemas com níveis consideráveis de BRS devido aos altos níveis de H_2S produzidos por estas bactérias, que inativa o composto sendo necessárias doses elevadas para fornecer um controle efetivo (BARTLETT e KRAMER, 2011).

Sulfato de tetraquishidroximetil fosfônio (THPS)

Este biocida é um composto iônico solúvel em água, que possui amplo espectro de ação contra bactérias, fungos e algas. Possui a vantagem de apresentar fácil manuseio e baixa toxicidade para o ambiente, além de ter boa compatibilidade com outros compostos utilizados em sistemas de tratamento de água (VIDELA, 2002). O THPS também apresenta ação efetiva no controle de BRS, conforme evidenciado por alguns autores.

O estudo de Lavania et al. (2011) mostrou que o THPS, na concentração de 100 mg L^{-1}, apresentou boa eficiência no controle de biofilmes de BRS em aço carbono, com uma redução de 3 ordens de grandeza para células planctônicas e sésseis.

Silva (2011), também demonstrou que este biocida possui eficácia no controle da corrosão microbiológica do aço por vários grupos microbianos, incluindo BRS. O estudo avaliou a ação de THPS (100 mg L^{-1}) acrescido ou não de xantana (2 mg L^{-1}), um biodispersante, e os resultados mostraram que tanto o biocida sozinho, quanto acrescido de xantana foram eficazes na eliminação das células de BRS no biofilme.

Já o trabalho de Xu, Li e Gu, (2012) avaliou o efeito de um potencializador, D-tirosina, para o biocida THPS para controlar biofilmes de BRS em aço carbono. THPS sozinho na concentração de 100 mg L^{-1} mostrou ser eficaz no controle de células sésseis, com redução de 5 ordens de grandeza. Quando 1 mg L^{-1} do potencializador foi aplicado, a concentração de THPS foi reduzida a metade e não houve detecção de crescimento de BRS.

Glutaraldeído

O glutaraldeído é utilizado como composto ativo em uma grande variedade de biocidas comerciais aplicados no controle de fungos, algas e bactérias, incluindo as bactérias redutoras de sulfato e biofilmes microbianos. Este composto apresenta a vantagem de ser eficaz em uma ampla faixa de temperatura e pH (VIDELA, 2002). É bastante utilizado para o controle microbiano em campos de petróleo, sistemas de tratamento de águas industriais e também para esterilização de instrumentos médicos e odontológicos (SARAVIA e MELE, 2005).

O mecanismo para a atividade biocida do glutaraldeído está relacionado com uma ligação cruzada (interação do biocida com a célula por ligações covalentes) com as camadas proteicas externas da célula, o que afeta a permeabilidade celular e impede assim, o transporte de nutrientes para a célula e a remoção de produtos residuais da célula, resultando na morte celular. (GONÇALVES, 2002). O glutaraldeído apresenta eficácia tanto contra as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas. Nas gram-positivas, reage com o peptideoglicano e ácido teicóico da parede celular, enquanto que nas gram-negativas reage com as lipoproteínas da membrana externa, impedindo o metabolismo celular (CLOETE, JACOBS E BROZEL, 1998).

Na Tabela 1 estão relacionados alguns estudos envolvendo a aplicação do glutaraldeído no controle de populações de BRS, os quais indicam que este biocida pode exercer diferentes efeitos que variam de acordo com a concentração e tempo de contato em que é utilizado, e também do tipo de micro-organismo para qual o tratamento está sendo aplicado. Uma vez que mesmo em se tratando de um mesmo grupo de micro-organismos, como no caso das BRS, estas possuem diversas espécies que podem reagir de formas diferentes à ação de um mesmo biocida em uma mesma concentração e tempo de contato.

Tabela 1- Aplicações do glutaraldeído no controle de BRS (Continua)

Micro-organismos	Biocida	Tratamento	Conclusões	Referência
Cultura mista enriquecida de BRS	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 10 e 100 mg L^{-1} Tempo de contato (t_c): 14 dias Tratamento realizado para controlar a acidificação microbiana causada por BRS, avaliando a produção de H_2S após a adição do biocida.	[10 mg L^{-1}] não reduziu a produção de H_2S. [100 mg L^{-1}] causou um efeito imediato na produção de H_2S, porém após a remoção do glutaraldeído, o H_2S foi recuperado rapidamente depois de 14 dias, atingindo a mesma concentração encontrada na ausência do biocida.	Reisel et al. (1996)
Cultura mista enriquecida de BRS e bactérias quimiorganotróficas	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 25, 100 e 500 mg/L Tempo de contato (t_c): 24h e 7 dias Tratamento para biofilmes formados de 10 semanas.	[25 mg L^{-1}] e [100 mg L^{-1}] com t_c = 24h reduziu a população bacteriana em 30%. [500 mg L^{-1}] com t_c de 7 dias, reduziu as células em 2 ordens de grandeza.	Rège e Sand (1998)
Cultura mista enriquecida de BRS	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 50, 100 e 500 mg/L Tempo de contato (t_c): 7h em reator contínuo Tratamento para células planctônicas e sésseis.	[100 mg L^{-1}] inibe a atividade das células planctônicas. [500 mg L^{-1}] retarda a recuperação do biofilme em ± 3 dias.	Gardner e Stewart (2002)

Tabela 1- Aplicações do glutaraldeído no controle de BRS (Conclusão)

Micro-organismos	Biocida	Tratamento	Conclusões	Referência
Desulfovibrio desulfuricans	Glutaraldeído e um potencializador "verde", etilenodiamina disuccinato (EDDS)	[Glutaraldeído] = 500 mg L^{-1} [Glutaraldeído] = 10, 20 e 30 mg L^{-1} + [EDDS] = 2000 mg L^{-1} Tempo de contato (t_c): 8 dias Tratamento para células planctônicas e sésseis.	[30 mg L^{-1}] de glutaraldeído +[2000 mg L^{-1}] de EDDS exibiu uma maior inibição da BRS do que [500 mg L^{-1}] de glutaraldeído, demonstrando que este composto pode potencializar significativamente a ação do glutaraldeído.	Wen et al. (2009)
Desulfovibrio Vulgaris	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 20, 100 e 500 mg L^{-1} Tempo de contato (tc): 5 dias Tratamento para células planctônicas.	[20 mg L^{-1}] e [100 mg L^{-1}] retardou o crescimento das BRS em 2 dias. [500 mg L^{-1}] afetou a atividade metabólica fortemente, causando uma elevada redução na produção de sulfeto.	Lee et al. (2010)
Desulfovibrio vulgaris e *Desulfovibrio gigas*	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 100 mg L^{-1} Tratamento feito por 90 dias para células planctônicas e sésseis	[100 mg L^{-1}] reduziu apenas 1 ordem de grandeza para células planctônicas e para células sésseis não houve redução significativa.	Lavania et al. (2011)
Desulfovibrio desulfuricans e cultura mista enriquecida de BRS	Glutaraldeído	[Glutaraldeído] = 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 mg L^{-1} Tratamento feito por 28 dias para células planctônicas e sésseis para ambas as culturas.	[25 mg L^{-1}] e [100 mg L^{-1}] inibiram a população de células planctônicas de *D. desulfuricans* e da cultura mista, respectivamente. [200 mg L^{-1}] inibiu as células sésseis de ambas as culturas.	Struchtemeyer et al. (2012)

Fonte: O autor, 2015.

1.7.4.1.3 Biocidas naturais

Os biocidas anteriormente citados são eficientes no controle da biocorrosão. Porém, a maioria apresenta a desvantagem de ser tóxico e de difícil degradação, podendo levar a um impacto negativo sobre o meio ambiente, se utilizados sem uma avaliação adequada. O uso de compostos naturais tais como extratos de plantas, alimentos ou resíduos agroindustriais pode ser considerado como uma forma ambientalmente favorável no tratamento da biocorrosão e vem sendo bastante explorado atualmente como uma alternativa aos biocidas comerciais (BHOLA et al., 2014; KORENBLUM et al., 2013). Uma série de óleos de plantas e extratos vegetais aquosos demonstrou possuir atividade inibidora contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Espécies como cravo, canela, cominho, tamarindo, alho, cebola, entre outros, estão sendo utilizados como conservantes, desinfetantes e antissépticos. Alguns desses compostos também são utilizados como inibidores da corrosão para o aço e níquel em meio ácido (BHOLA et al., 2014).

A ação do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre biofilmes formados em sistema dinâmico utilizando aço carbono 1020 foi estudada por Viana et al., (2010). O efeito biocida após o tempo de contato (0, 60, 90 e 120 minutos), foi determinado pela contagem microbiana de cinco tipos de grupos de micro-organismos, dentre eles a BRS. Os resultados mostraram que o óleo essencial de *L.gracilis* Schauer possui ação efetiva sobre biofilmes, obtendo uma redução a zero do número mais provável (NMP) para BRS a partir de 115 minutos de contato.

O efeito do óleo essencial de capim limão no controle de BRS planctônicas e sésseis, em cupons de vidro e aço carbono, também foi avaliado. As concentrações de óleo testadas durante o estudo foram de 0,085; 0,17 e 0,34 mg mL^{-1} com tempo de contato de 7 dias. O óleo de capim limão apresentou resultados satisfatórios no controle da biocorrosão por BRS, possuindo efeito bactericida (nas concentrações de 0,17 e 0,34 mg mL^{-1}), pois não houve recuperação de células viáveis após o cultivo em meio de cultura (KORENBLUM et al., 2013).

Bhola et al. (2014) testaram a eficácia do extrato de Nim (*Azadirachta indica*), na concentração de 4% m/m e tempo de contato de 8 dias, no controle da biocorrosão do aço API 5L X80 por um consórcio de BRS. O estudo foi realizado utilizando técnicas de microscopia e eletroquímicas (EIE) e os resultados revelaram que o extrato de Nim reduziu a taxa de biocorrosão por BRS em 50%.

Ocando et al. (2013), também avaliaram a ação do extrato de Nim no controle de biofilmes por BRS, em comparação com um biocida comercial, THPS, utilizado como padrão. O estudo foi feito a partir da quantificação das BRS e por técnicas eletroquímicas de potencial de circuito aberto, resistência à polarização linear e polarização potenciodinâmica. A concentração utilizada para o extrato foi de 3% v/v e 300 mg L^{-1} para THPS, ambos com tempo de contato de 5 dias, com adição dos biocidas no início dos testes. Os resultados confirmaram que o biocida natural possui comportamento semelhante ao biocida comercial, demonstrando que o extrato de Nim pode ser utilizado como um biocida ambientalmente favorável. Contudo, os autores verificaram perda de efetividade do produto após aproximadamente 72h de incubação.

Dentre os compostos naturais citados anteriormente, o alho apresenta-se como uma possibilidade devido às suas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas. O alho será melhor detalhado no tópico a seguir.

1.8 **Alho (*Allium sativum*)**

O alho (*Allium sativum*) é um vegetal da família das liliáceas. É o mais antigo vegetal utilizado, não só na culinária, mas também como medicamento, devido a sua diversificada atividade biológica, incluindo ações antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes, entre outras (LEONÊZ, 2008; NENCINI et al., 2007). O bulbo do alho possui de 0,04 a 0,37% m/m de enxofre, nas formas de dissulfeto de dialila, trissulfeto de dialila, sulfóxide S-alil-L cisteína (aliina), além de outros compostos voláteis. Minerais, enzimas, lipídeos e proteínas também estão presentes (LEONÊZ, 2008). A Tabela 2 mostra a composição química do alho *in natura*.

Tabela 2 – Composição química do alho *in natura* em porção de100 gramas (Continua)

Composto	Quantidade (mg)
Glicídios	29300
Proteínas	5300
Lipídeos	200

Tabela 2 – Composição química do alho *in natura* em porção de100 gramas (Conclusão)

Composto	Quantidade (mg)
Fibras	1660
Vitamina B1	0,20
Vitamina B6	3,33
Vitamina C	31,1
Ácido Fólico	3,10
Sódio	69,9
Cálcio	38,0
Fósforo	134,0
Ferro	1,04
Potássio	607,6
Enxofre	450,0
Cobre	0,17
Zinco	8,83
Selênio	24,9
Iodo	9,0

Fonte: Adaptado de Crizel, 2009.

A característica antimicrobiana do alho está relacionada, com os compostos alicina (obtido a partir da aliina) e garlicina. Ambos possuem atividade bacteriostática e atuam tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (CRIZEL, 2009).

O alho possui compostos sulfurados e não sulfurados que apresentam atividades biológicas. Dentre os sulfurados podem ser citados a alicina, que possui atividade antibiótica e antifúngica e o ajoeno, com propriedades antibióticas. Já entre os não sulfurados destacam-se as saponinas, as escordininas e os ácidos fenólicos todos com propriedades antibacterianas (GARCÍA-GÓMEZ e SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000).

Benkeblia (2004) testou a atividade antimicrobiana do extrato de alho e extrato de cebola em concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ml L^{-1} para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmomella Enteritidis* e também para fungos. O extrato de alho apresentou ação antimicrobiana satisfatória, sendo superior ao extrato da cebola. De acordo com Cañizares et al., (2004), extrato de alho em concentrações de 2 a 5 mg L^{-1} demonstrou atividade bactericida contra o *Helicobacter pylory*, principal bactéria responsável pelas

úlceras gástricas e duodenais. Zalepugin et al. (2010), isolaram alguns componentes sulfurados do alho (alicina, dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila) e avaliaram suas ações como biocidas no controle de bactérias como, *Candida utilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aurantiaca* e *Escherichia coli.* A alicina apresentou propriedade bacteriostática para *P.aurantiaca* e *E. coli*.O composto trissulfeto de dialila mostrou ação bacteriostática para *C. utilis* e *B. cereus.*Já o componente dissulfeto de dialila apresentou ação biocida para todas as bactérias testadas.

Além das propriedades medicinais do alho citadas, atualmente este também vem sendo utilizado como um inibidor de corrosão natural. De acordo com Pereira et al. (2012), o extrato da casca do alho liofilizado em concentrações variando de 100 a 400 mg L^{-1} é um excelente inibidor de corrosão para o aço carbono em solução de ácido clorídrico 1 mol L^{-1}. A ação inibitória deste composto foi mais eficiente quando utilizada a concentração mais alta (400 mg L^{-1}), e isto foi comprovado por ensaios eletroquímicos de EIE e polarização potenciodinâmica e também através da análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Afia et al. (2014) comprovaram o efeito de inibição também para aço carbono em HCl 1 mol L^{-1}, do óleo essencial de alho em concentrações que variaram de 0,5 a 2,5 g L^{-1}. O estudo também foi feito a partir de ensaios eletroquímicos de EIE e polarização potenciodinâmica e a maior eficiência de inibição foi obtida para a concentração de 2,5 g L^{-1}.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais, os equipamentos e os meios/soluções utilizados nos ensaios realizados neste trabalho, e também serão descritos todos os procedimentos experimentais empregados.

2.1 Corpos de prova

Foram utilizados cupons metálicos de aço carbono AISI 1020 cuja composição química em % massa está descrita na Tabela 3. Dois tipos de cupons foram utilizados, conforme descrito a seguir e apresentado na Figura 14.

Tabela 3- Composição química do aço carbono AISI 1020

Elemento	C	Mn	P	$S_{máx}$	Si	Cu	Cr	Ni
Massa (%)	0,16	0,63	0,012	0,031	0,012	0,01	0,03	0,01

Fonte: Paula, 2010

Figura 14- Corpos de prova utilizados nos ensaios de quantificação celular (A) e eletroquímicos (B)

Fonte: O autor, 2015.

<u>Ensaios de quantificação celular</u> – foram utilizados cupons com dimensões em torno de (2 x 1,8 x 0,1) cm e área média de aproximadamente 8 cm² (Figura 14A). Os corpos de prova

foram lixados em ambas as faces com lixas d'água de 100 a 600 mesh de granulometria, lavados com água destilada e álcool etílico e secos com jato de ar quente. Em seguida, foram acondicionados em dessecador até o momento da imersão no meio de cultura.

Ensaios eletroquímicos - foram utilizados corpos de prova com dimensões em torno de (1,8 x 1,7 x 0,1) cm e área média exposta de aproximadamente 3 cm² (Figura 14B). Um fio condutor de cobre foi soldado em cada cupom metálico para proporcionar a conexão elétrica do sistema e embutidos em resina epóxi para que apenas uma de suas faces ficasse exposta ao meio corrosivo. O processo de lixamento e limpeza dos eletrodos foi o mesmo usado para os ensaios de quantificação celular.

2.2 Fluido de Processo e Meio de Cultura

A cultura bacteriana utilizada no presente trabalho foi uma cultura mista contendo o grupo de bactérias conhecido como bactérias redutoras de sulfato (BRS). A cultura foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

O fluido de processo escolhido para ser utilizado em todos os ensaios foi água do mar sintética. Esta foi utilizada para o preparo dos meios de cultura, para os ensaios com biocidas aplicados após a formação do biofilme e também para a realização dos ensaios eletroquímicos (eletrólito). Sua composição é descrita na Tabela 4.

Tabela 4- Composição da água do mar sintética (quantidade para o preparo de 10L)
(Continua)

Reagentes	Quantidades (g)
Solução 1	
NaF	0,03
$SrCl_2.6H_2O$	0,20
H_3BO_3	0,30
KBr	1,00
KCl	7,00

Tabela 4- Composição da água do mar sintética (quantidade para o preparo de 10L) (Conclusão)

Reagentes	Quantidades (g)
Solução 2	
$CaCl_2$	11,13
Solução 3	
Na_2SO_4	40,00
Solução 4	
$MgCl_2.6H_2O$	107,80
Solução 5	
NaCl	235,00
Solução 6	
$NaSiO_3.9H_2O$	0,20
Na_2EDTA	0,01
$NaHCO_3$	2,00

Fonte: Adaptado de Pagnin, 2008.

Os componentes das soluções 1, 4 e 6 foram dissolvidos em água destilada e avolumados em balões volumétricos de 1L. Os reagentes das soluções 2, 3 e 5 também foram dissolvidos em água destilada e avolumados em balões volumétricos de 2L. Após o preparo das soluções, estas foram transferidas para um barrilete e foi adicionado mais 1L de água destilada, completando o volume de 10L. A solução foi agitada por 20 horas e em seguida filtrada em membrana Millipore de 0,45µm de porosidade.

O meio de cultura utilizado para o cultivo das BRS foi o meio Baar's modificado (adaptado de ATTC meio 1249), o qual é apresentado na Tabela 5.

O meio foi preparado em condições de anaerobiose, sob purga de gás nitrogênio, pois as BRS são micro-organismos anaeróbios. O pH do meio foi ajustado para 7,5 (pH ideal para o crescimento das BRS) adicionando-se solução de NaOH 1 mol L^{-1} e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 5- Composição do meio Baar's modificado utilizado para o crescimento microbiano

Composição	Quantidade
$MgSO_4$	2,0 g
Citrato de Sódio	5,0 g
$CaSO_4$	1,0 g
NH_4Cl	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
Lactato de Sódio (50% m/v)	7,0 mL
Extrato de Levedura	1,0 g
Solução de resazurina (0,025% m/v)	4,0 mL
Tioglicolato de Sódio	0,124 g
Água do mar sintética	1000 mL

Fonte: Adaptado de ATTC Meio 1249.

O meio de cultura Baar's foi utilizado tanto para os ensaios bióticos (na presença de BRS) como para os ensaios abióticos (na ausência de BRS) e com biocidas.

2.3 Biocidas

Foram utilizados dois biocidas nos ensaios, sendo um comercial e um natural. O biocida comercial foi uma solução de glutaraldeído 25% (Sigma Aldrich). O biocida natural escolhido foi óleo de alho (Alhonat Nativa), em cápsulas contendo 250 mg de óleo cada.

Para a realização dos ensaios contendo biocidas foram estudadas concentrações diferentes para cada composto.

2.4 Sistemas utilizados para os ensaios de quantificação microbiana e eletroquímicos – Abióticos e Bióticos

Os ensaios foram realizados em frascos de 100 mL, denominados reatores. Para os ensaios abióticos (na ausência de BRS) foram adicionados aos reatores 80 mL do meio de cultura Baar's e para os ensaios bióticos (na presença de BRS), 80 mL do meio Baar's inoculado à 10% v/v com a cultura mista contendo BRS.

Para os ensaios bióticos (na presença de BRS), antes da inoculação foi adicionado ao meio de cultura solução de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 0,5 g L^{-1} previamente filtrada em membrana Millipore de 0,45µm de porosidade. Esta solução foi adicionada com o objetivo de fornecer fonte de ferro ao meio de cultura.

Antes da imersão nos meios de cultura, os corpos de prova usados para os ensaios de quantificação celular foram esterilizados em fluxo laminar por 20 minutos (cada face), pela ação da luz ultravioleta (UV). Em seguida, os cupons foram inseridos no reator, permanecendo suspensos na solução por meio de uma fita teflon, durante o período de exposição (Figura 15). Enquanto ocorria a imersão dos corpos de prova, os reatores foram purgados com gás nitrogênio, para garantir uma baixa concentração de O_2 dissolvido. O tempo total do experimento para os ensaios bióticos foi de 35 dias, realizados a cada 7 dias utilizando um reator para cada tempo de ensaio. Depois do preparo do sistema os reatores foram incubados em estufa BOD 411D da NOVA ÉTICA a temperatura de 30°C, e após o período de imersão foram realizados os ensaios de quantificação microbiana.

Figura 15 - Reatores dos ensaios de quantificação microbiana com o corpo de prova suspenso por fita teflon

Fonte: O autor, 2015.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados em duplicata, à exceção dos ensaios abióticos. Após esterilização em fluxo laminar, conforme explicado anteriormente, um eletrodo foi imerso em cada reator (Figura 16), também sob purga de gás nitrogênio. Neste caso, os ensaios também duraram 35 dias, realizados a cada 7 dias para os ensaios abióticos e bióticos e também foram incubados em estufa a 30°C.

Figura 16 - Reatores dos ensaios eletroquímicos: sem inóculo (esquerda) e com inóculo (direita)

Fonte: O autor, 2015.

2.5 Sistema utilizado para os ensaios com biocidas

Para os ensaios com biocidas foram adotados dois métodos experimentais conforme será explicado a seguir. Os ensaios realizados, após o tempo de contato dos corpos de prova com o biocida, foram de quantificação microbiana, MEV e eletroquímicos. Estes ensaios foram comparados com aqueles encontrados para o corpo de prova incubado por 7 dias em meio de cultura contendo BRS, mas sem a adição dos biocidas, sendo denominado de “controle”.

2.5.1 Biocidas aplicados antes da formação do biofilme

Nesta etapa a adição dos biocidas foi feita de modo a evitar o crescimento das BRS e a posterior formação de biofilme. O procedimento foi o mesmo descrito no item 2.4 para os ensaios com BRS, porém antes da inoculação foi adicionada a quantidade desejada de biocida ao meio de cultura. Toda a etapa de esterilização, inserção dos corpos de prova aos reatores e incubação foi a mesma citada anteriormente.

A concentração utilizada para o biocida comercial (glutaraldeído) foi de 0,01 % m/v e para o biocida natural (óleo de alho) de 3% m/v. Nos ensaios com óleo de alho foi adicionado um surfactante, laurato de potássio na concentração de 10^{-3} mol L^{-1}, pois o óleo não é solúvel em solução aquosa (SILVA et al. 2007). Todos os ensaios tiveram a duração de 7 dias.

2.5.2 Biocidas aplicados após a formação do biofilme

Neste caso os biocidas foram aplicados após a formação de biofilme para verificar seu efeito bactericida. Os cupons foram adicionados aos reatores inoculados com a BRS e permaneceram em contato com a solução por 7 dias visando a formação de um biofilme com uma quantidade satisfatória de micro-organismos. Depois de formado o biofilme os cupons foram transferidos, assepticamente, para reatores contendo água do mar sintética estéril e os biocidas nas mesmas concentrações citadas anteriormente (0,01 % m/v para o glutaraldeído e 3% m/v para o óleo de alho). Foram utilizados dois tempos de contato do cupom com os biocidas, 24 horas e 7 dias.

2.6 Quantificação Microbiana

A quantificação microbiana foi feita apenas para as células sésseis, sendo o cupom metálico removido assepticamente do reator, lavado cuidadosamente por imersão em água destilada, para a remoção de células livres, e transferido para um tubo falcon contendo a solução de diluição (Tabela 6). Em seguida, para remover o biofilme aderido, o tubo contendo

o cupom foi agitado em vórtex por 4 minutos e sonificado em sistema de limpeza ultrassônica por 2 minutos. Após a remoção do biofilme, foram retiradas alíquotas da suspensão para quantificação.

Tabela 6- Composição da solução de diluição.

Reagentes	Quantidade
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,100 g
Solução de resazurina (0,025% m/v)	4 mL
Água do mar sintética	1000 mL

Fonte: Adaptado de Penna, 2004.

A quantificação microbiana foi realizada através do método do número mais provável (NMP).

Antes da inoculação da amostra foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL de solução de tioglicolato de sódio estéril (12,4 g L^{-1}) para cada 9 mL de meio Postgate E. Em seguida foram inoculados 1 mL da amostra também para cada 9 mL de meio. O meio Postgate E foi o meio utilizado para a quantificação microbiana e este é apresentado na Tabela 7.

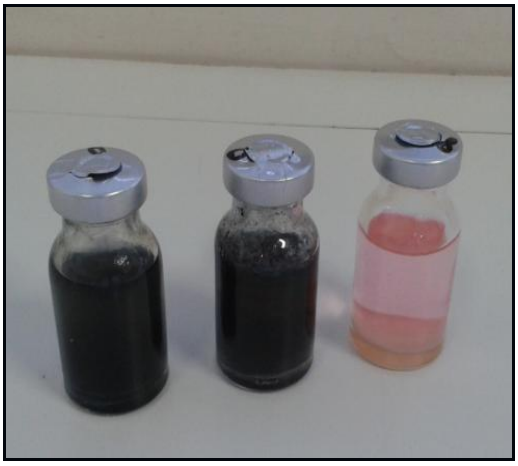
Tabela 7 - Composição do meio Postgate E modificado para a quantificação microbiana

Composição	Quantidade
KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
Na_2SO_4	1,0 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,67 g
$MgCl_2.6H_2O$	1,83 g
Lactato de sódio (50% m/v)	7 mL
Extrato de levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,5 g
Ágar	1,9 g
Resazurina (0,025% m/v)	4,0 mL
Água do mar	1000 mL

Fonte: Postgate, 1984.

Foram utilizados para os ensaios de quantificação microbiana frascos de penicilina de 10 mL, devidamente vedados com tampas de borracha e lacres metálicos, após purga de gás nitrogênio. O resultado positivo para a presença de BRS era avaliado pela coloração preta nos frascos, devido à formação de precipitado de sulfeto de ferro. Já a coloração rosa indicava um resultado negativo, devido a ausência de crescimento de BRS, conforme pode ser observado na Figura 17. O tempo de incubação foi de 28 dias a temperatura de 30°C.

Figura 17 - Exemplificação do método de quantificação microbiana por NMP



Fonte: O autor, 2015.

A redução da população bacteriana após a adição dos biocidas foi calculada através da equação 2:

$$\%\ \text{redução} = \frac{\log(\text{NMP}_{\text{controle}}) - \log(\text{NMP}_{\text{c/biocida}})}{\log(\text{NMP}_{\text{controle}})} \times 100 \qquad (2)$$

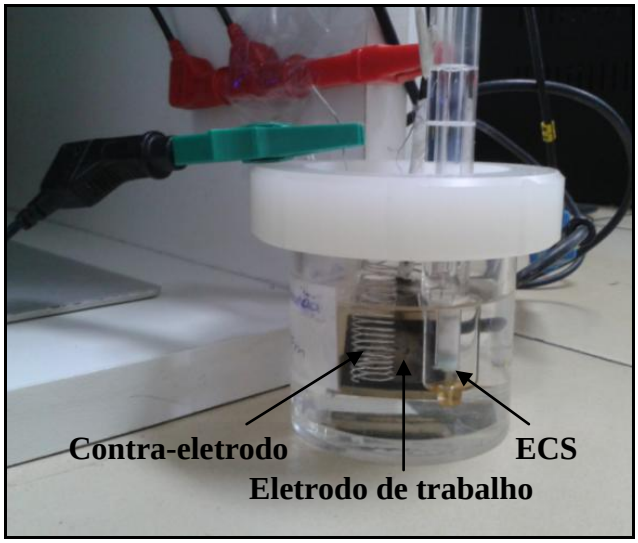
2.7 Ensaios eletroquímicos

Os ensaios eletroquímicos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e de polarização potenciodinâmica do aço carbono foram feitos inicialmente 2 horas após imersão do corpo de prova no meio corrosivo (t = 0 dia) e, posteriormente a cada 7 dias de exposição, tanto para os ensaios abióticos, como para aqueles com BRS. Para os ensaios com biocidas foram utilizados dois tempos de imersão, 24 horas e 7 dias, conforme explicado nos itens 2.5.1 e 2.5.2. Os ensaios foram realizados utilizando o potenciostato Autolab modelo

PGSTAT302N com uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: o eletrodo de trabalho (eletrodo de aço carbono, previamente incubado em meio de cultura, contendo ou não BRS), o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS), e um contra-eletrodo de platina, conforme ilustrado na Figura 18.

Nos ensaios de EIE foi utilizada uma faixa de frequência de 10^5 a 10^{-3} Hz, com uma amplitude de 10 mV. Para os ensaios de polarização potenciodinâmica, a faixa de potencial aplicada foi de -1 a 1 V, com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1}. Todos os ensaios eletroquímicos foram feitos após estabilização do sistema em seu potencial de circuito aberto. O eletrólito utilizado nos ensaios eletroquímicos foi água do mar sintética.

Figura 18 - Célula eletroquímica contendo os três eletrodos



Fonte: O autor, 2015.

Os ensaios de EIE foram simulados através de circuitos elétricos equivalentes utilizando o software NOVA 1.10 Metrohm Autolab. O valor da capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) foi calculado a partir do elemento de fase constante (EFC) através da equação 3:

$$C_{DCE} = (EFC)^{\frac{1}{N}} \times R_{tc}^{(\frac{1}{N}-1)} \qquad (3)$$

A taxa de corrosão obtida a partir da extrapolação das retas de Tafel foi calculada através da equação 4:

$$\text{Taxa de corrosão}\left(\frac{mm}{ano}\right) = 3650 \times \frac{Icorr}{\Delta t} \times \frac{1}{d \times A} \qquad (4)$$

Onde:

I_{corr} – densidade de corrente de corrosão (A/cm²) após o tempo de exposição

Δt – tempo de exposição (dias)

d - densidade do aço carbono 1020 = 7,8 g/cm³

A – área superficial do cupom (cm²)

3650 – Ano (x10)

2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada para o corpo de prova exposto ao meio com BRS, por um tempo de imersão de 7 dias, e também para os corpos de prova inseridos nos meios com biocidas antes e após a formação de biofilme. Para a condição de ensaio antes da formação de biofilme, óleo de alho e glutaraldeído foram aplicados ao meio de cultura antes da inoculação com BRS, por um tempo de imersão também de 7 dias. Já para os ensaios depois de formado o biofilme, o óleo de alho e glutaraldeído foram adicionados à água do mar sintética estéril contendo o cupom com o biofilme. Nesse caso, os períodos de imersão foram de 24 horas e 7 dias.

Os cupons foram retirados do reator e lavados cuidadosamente por imersão em água destilada, para a remoção de células livres, e em seguida foram secos em estufa a 37°C por 1h. As amostras foram metalizadas com ouro utilizando metalizador modelo DENTON VACUUM DESK V e em seguida foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM G510 LV em alto vácuo, detector SEI, tensão de 20kV, com aumentos de imagens de 500, 1000 e 5000X.

Para a análise de MEV após a remoção do biofilme, os cupons foram tratados por decapagem ácida em solução de Clark por 2 minutos. Em seguida os cupons foram lavados com água destilada e secos com jato de ar quente. A solução de Clark era composta por 100 mL de HCl , 2g de Sb_2O_3 e 5g de $SnCl_2$. (PAULA, 2010).

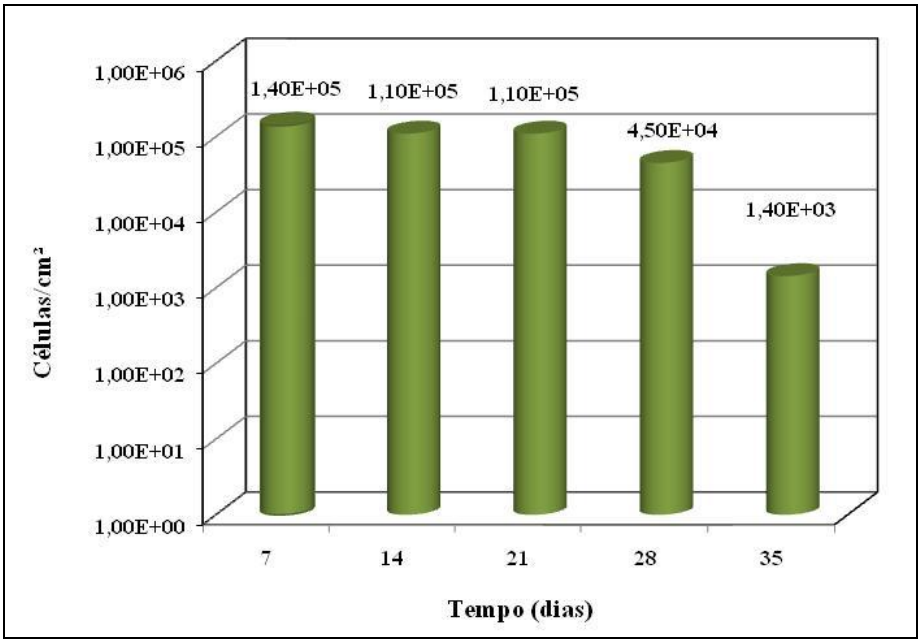
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da CMI por BRS em comparação com um ensaio abiótico

3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano

O inóculo inicial utilizado em todos os ensaios foi de $9{,}1 \times 10^6$ células de BRS/mL. Este valor permitiu a realização dos ensaios com uma quantidade expressiva de células, mantendo também um número de células viáveis que foram capazes de se reproduzir nas condições impostas de temperatura, pH e baixo teor de oxigênio, ou seja em condições de anaerobiose. A quantificação microbiana foi feita para as BRS aderidas ao substrato metálico (células sésseis) com 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Os resultados obtidos na quantificação dessas células, realizadas pela técnica do NMP, estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Quantificação microbiana para BRS sésseis



Fonte: O autor, 2015.

O crescimento das células de BRS sésseis durante os 35 dias de ensaio apresentou valores que variaram entre $1{,}4 \times 10^5$ e $1{,}4 \times 10^3$ células/cm². É possível notar que, embora não

houvesse diferenças significativas até 21 dias de ensaio, com apenas 7 dias de crescimento a concentração de BRS já era a maior encontrada durante o tempo total do ensaio, confirmando a capacidade deste grupo de bactérias em colonizar e aderir em superfícies sólidas. BRS são capazes de produzir substâncias poliméricas extracelulares (SPE), o que favorece esta aderência (BEECH et al., 1991; ZINKEVICH et al., 1996; PÉREZ et al., 2007). SPE consiste de proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídeos, e sua composição varia de acordo com a espécie microbiana, estado fisiológico das células e fatores ambientais (BEECH et al., 2005).

A partir do 21° dia de ensaio, o número de BRS aderidas à superfície diminuiu. Esta redução pode ser atribuída à falta de nutrientes e também pelo aumento da concentração de H_2S no meio. O acúmulo de células no biofilme está relacionado com a atividade metabólica dos micro-organismos. Assim, a formação de biofilmes depende da disponibilidade de nutrientes e também da presença e concentração de metabólitos tóxicos, no meio, a um determinado tipo de micro-organismo (COSTERTON, 1995). Concentrações de H_2S entre 550 e 250 mg/L, para valores de pH de 6,2-6,6 e 7,0, respectivamente, são tóxicos para *Desulfovibrio* sp., inibindo seu metabolismo (REIS et al., 1992; GALVÃO, 2008).

O valor médio de pH do meio contendo BRS durante o tempo total de ensaio foi de 7,74. Assim, pode-se supor que o H_2S encontrava-se em sua forma dissociada, HS^-. Esta forma é considerada menos tóxica que a forma não dissociada (H_2S(solúvel)), pois a molécula neutra pode permear a membrana celular (STEFANIE et al., 1994).

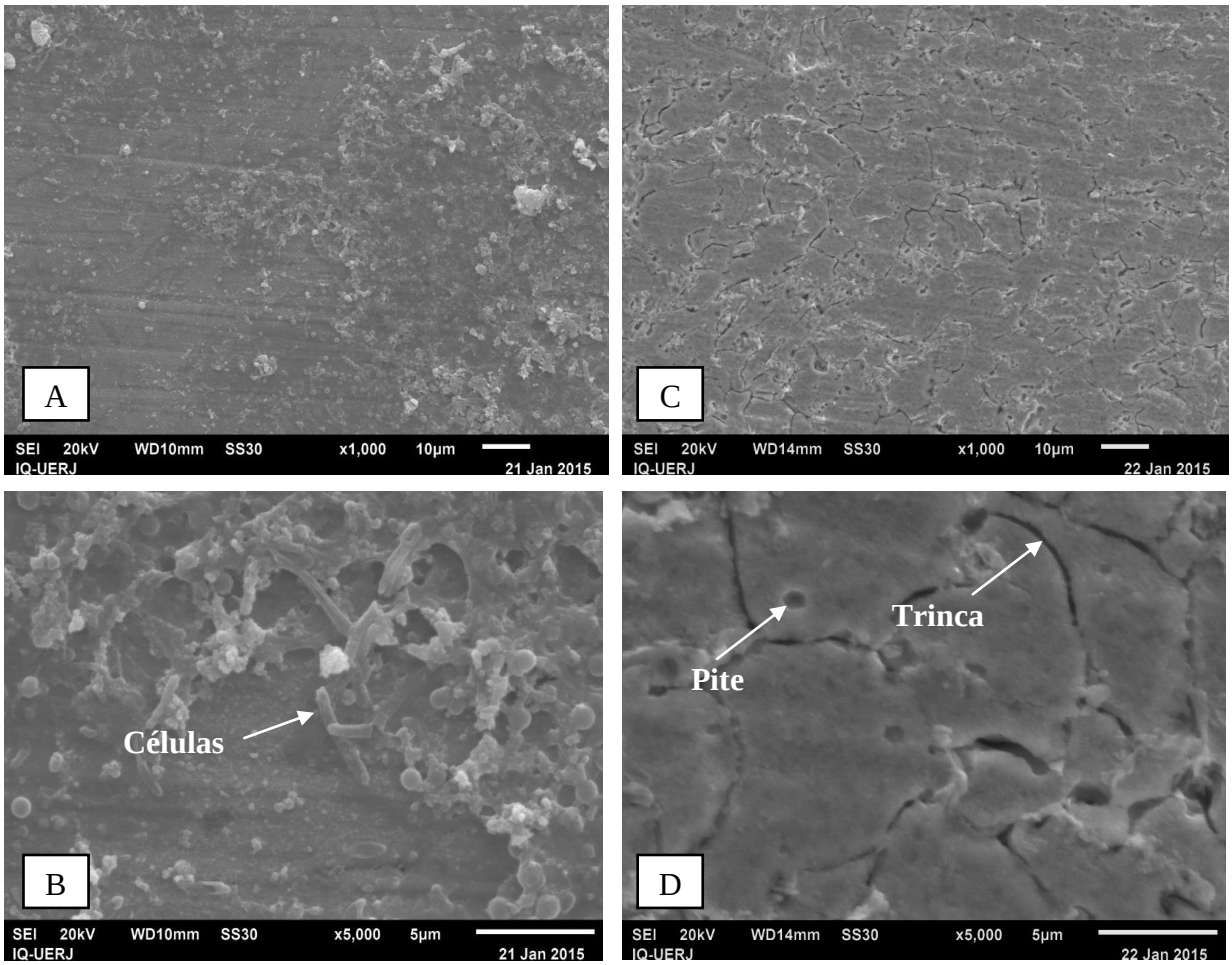
Os resultados obtidos a partir da quantificação microbiana demonstraram que as condições utilizadas (temperatura, pH e baixo teor de O_2) nos ensaios para o cultivo das BRS foram satisfatórias, permitindo o desenvolvimento e crescimento destas bactérias.

3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Conforme verificado no ensaio de quantificação microbiana, durante o tempo de imersão de 7 dias foi observado o maior número de micro-organismos aderidos à superfície (Figura 19). Assim, este foi o período de imersão escolhido para realizar a análise de MEV, bem como os ensaios com biocidas. As micrografias apresentadas na Figura 20 foram obtidas com 7 dias de ensaio para o corpo de prova imerso em meio contendo BRS e exibem a adesão

microbiana através da formação de biofilme. A fim de verificar um possível ataque ao substrato, são também mostradas micrografias realizadas após a remoção do biofilme.

Figura 20- Microscopia da superfície do aço carbono 1020 após 7 dias de imersão em meio contendo BRS. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

A Figura 20A mostra que com 7 dias de imersão do cupom no meio contendo BRS houve a formação de um aglomerado celular irregularmente distribuído por praticamente toda a extensão da superfície do aço carbono. É válido lembrar que na condição de 7 dias de imersão foi observado o maior número de micro-organismos aderidos à superfície (Figura 19), o que explicaria a quantidade de aglomerados observados. A Figura 20-B apresenta uma ampliação de uma região do biofilme, sendo possível visualizar bactérias no formato de bacilos. Também se observa a presença de alguns flocos na superfície, que provavelmente se devem à formação de SPE pela atividade metabólica da BRS. Resultado semelhante foi

encontrado no trabalho de Liu et al. (2012), que sugere que a produção de SPE por BRS pode ser útil para a criação de um biofilme não homogêneo na superfície do metal, modificando o ambiente físico e favorecendo as reações eletroquímicas responsáveis pela corrosão localizada.

Após a remoção do biofilme (Figuras 20C e 20D) foi possível observar a presença de corrosão localizada por pites, bem como a formação de várias trincas em quase toda a extensão da superfície do aço, sugerindo também possível corrosão intergranular. Bhola et al. (2013), Congmin et al. (2008) e Alabbas et al.(2013) também verificaram corrosão por pite em seus trabalhos, confirmando que a atividade metabólica que as BRS exercem na superfície do aço leva a uma aceleração da corrosão do tipo localizada. Embora a dosagem de íons sulfetos não tenha sido realizada na presente dissertação, é possível que uma grande quantidade deste metabólito tenha sido produzida, contribuindo também para a formação de corrosão intergranular no aço. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee e Charackils (1993), que em seus estudos para avaliar a corrosão do aço por biofilmes de uma população microbiana mista, incluindo BRS, observaram a formação de corrosão intergranular em toda a superfície do metal, bem como a presença de pites.

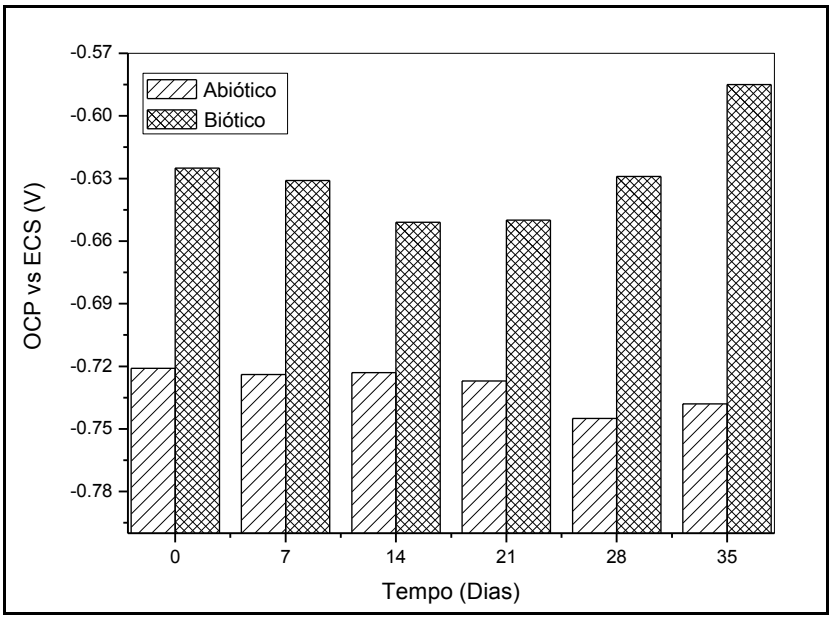
3.1.3 Ensaios eletroquímicos

3.1.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 21 exibe o potencial de circuito aberto no aço carbono 1020 medido em cada tempo de ensaio. Os corpos de prova foram previamente incubados no meio de cultura, na ausência (ensaio abiótico) e na presença de BRS (ensaio biótico).

Para os ensaios realizados na presença de BRS, houve um deslocamento do potencial de circuito aberto do substrato para valores mais positivos (mais nobres) para todos os tempos de imersão estudados, quando comparado aos ensaios sem micro-organismos. Essa variação de potencial é conhecida na literatura como “enobrecimento” (LITTLE, LEE, e RAY, 2008). Embora o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorra ainda não seja totalmente conhecido, o “enobrecimento” tem sido atribuído à reprodução e colonização das BRS no corpo de prova de aço, levando à formação de biofilme e à alteração dos processos eletroquímicos na superfície do material (ALABBAS et al., 2013).

Figura 21- Potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para todos os tempos de imersão, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico)



Fonte: O autor, 2015.

O acúmulo superficial de SPE e de produtos de corrosão tais como sulfeto de ferro, podem ser associados ao enobrecimento através do aumento das taxas de redução catódica, levando a um aumento da corrosão do metal (LITTLE, LEE e RAY, 2008; ALABBAS et al., 2013; BHOLA et al., 2014). O fenômeno de enobrecimento pode também aumentar a probabilidade de corrosão localizada por pites ou sob frestas (LITTLE, LEE e RAY, 2008).

3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de EIE foi utilizada para avaliar a influência da ação das BRS no processo de corrosão do aço carbono 1020 em água do mar sintética. Os diagramas de Nyquist, Bode e fase para os corpos de prova previamente incubados no meio de cultura, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico), em diferentes tempos de ensaio, são apresentados nas Figuras 22 a 24.

Figura 22 - Diagramas de Nyquist para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Continua)

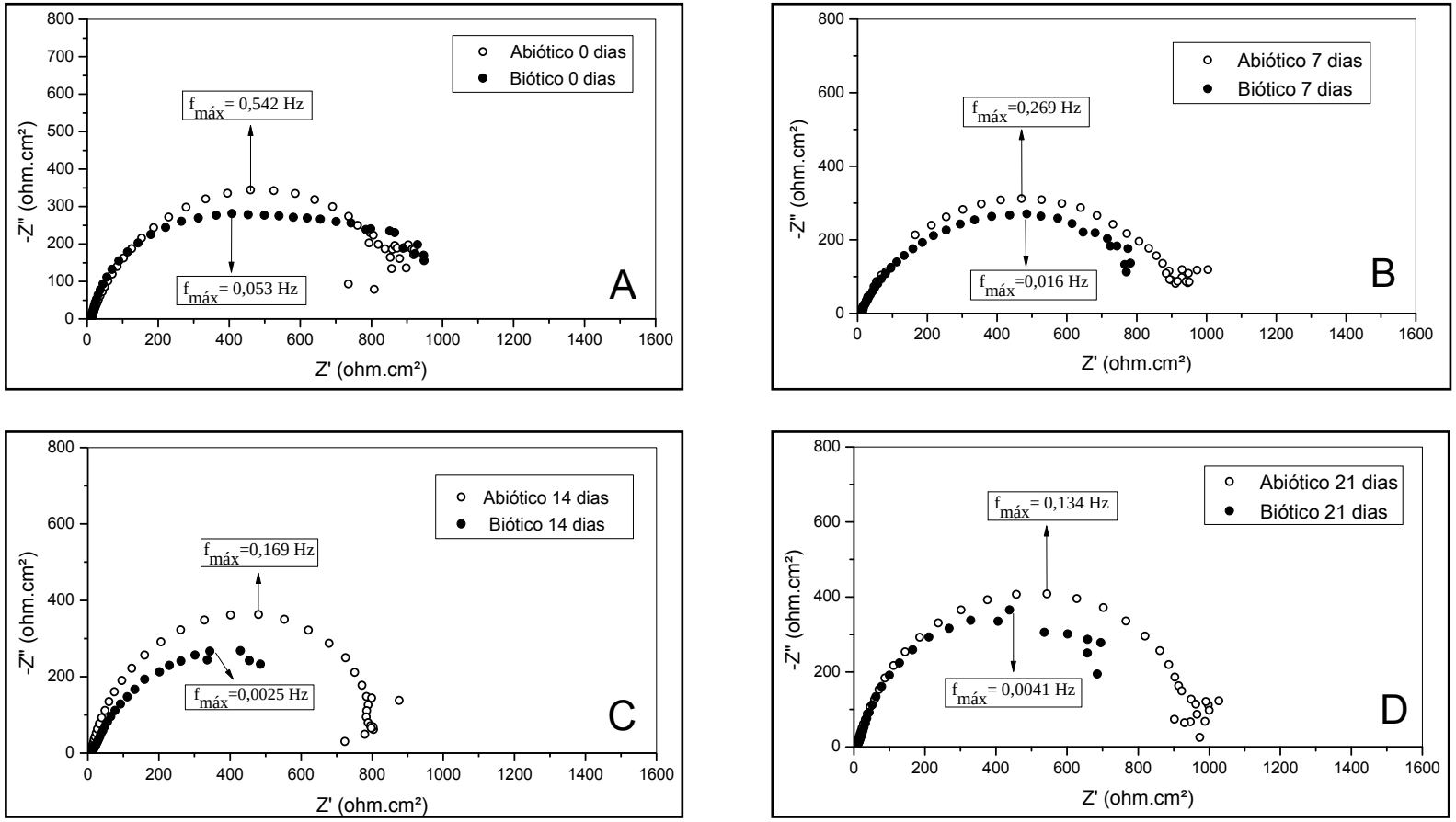
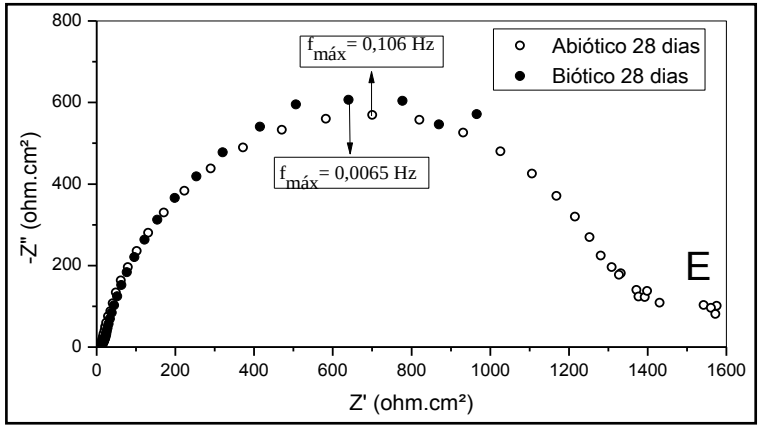
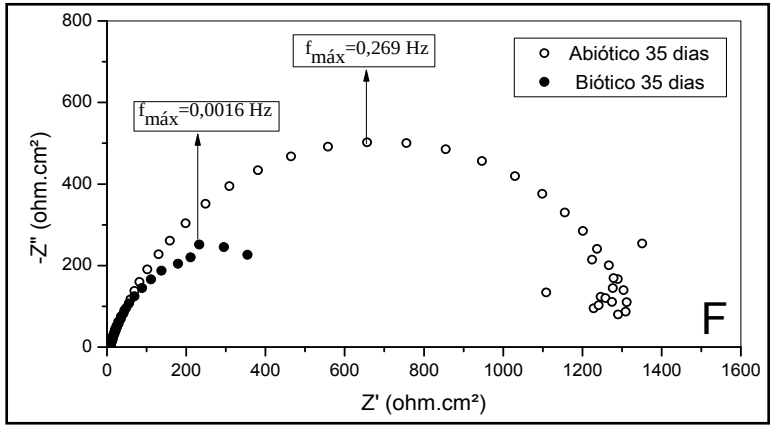


Figura 22 - Diagramas de Nyquist para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Conclusão)





Fonte: O autor, 2015.

Figura 23 - Diagramas de Bode para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias,na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Continua)

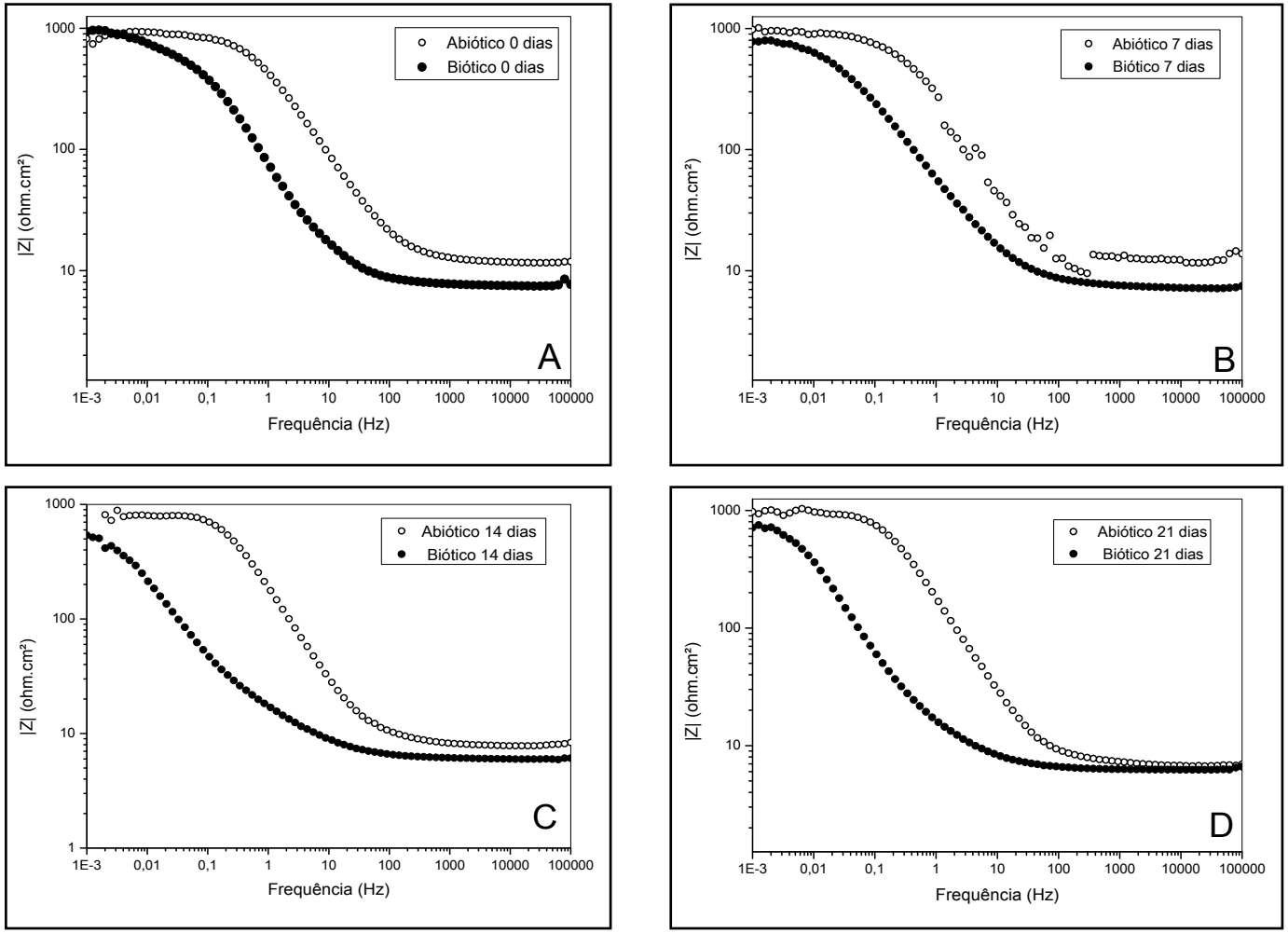
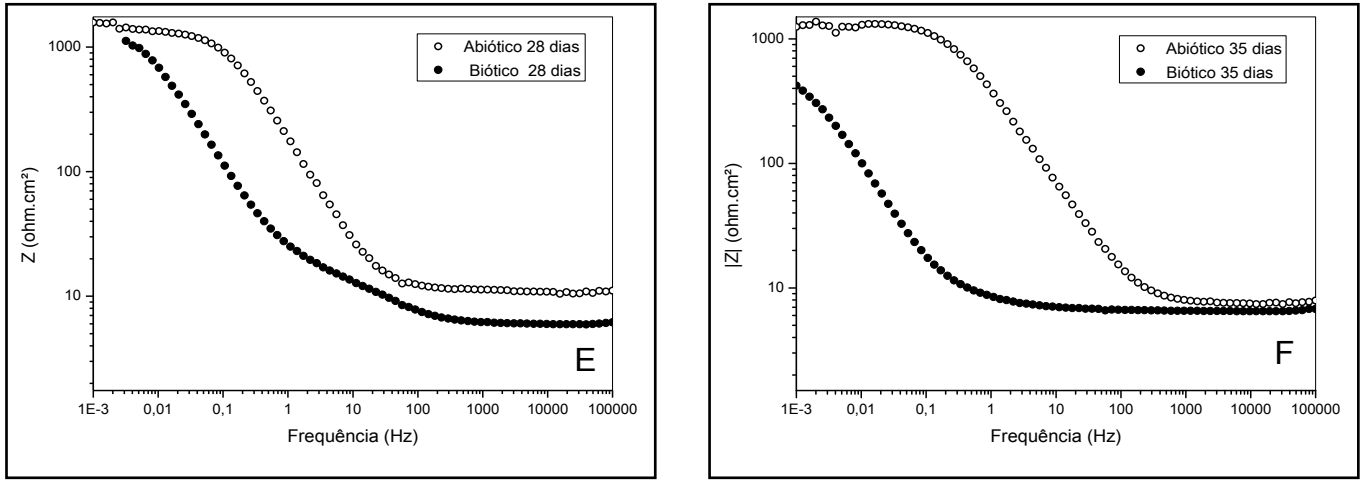


Figura 23 - Diagramas de Bode para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias,na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Conclusão)



Fonte: O autor, 2015.

Figura 24 - Diagramas de Fase para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Continua)

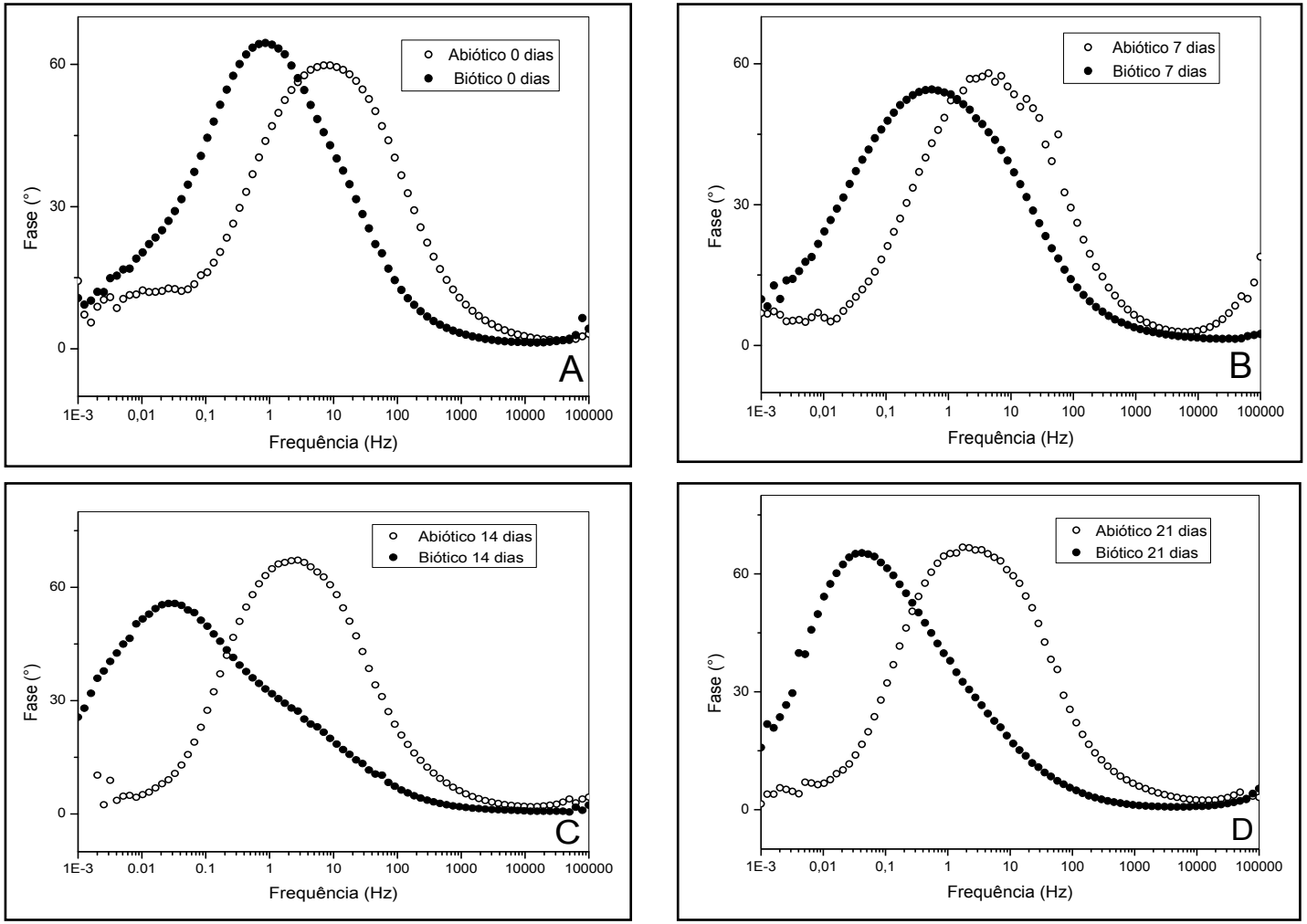
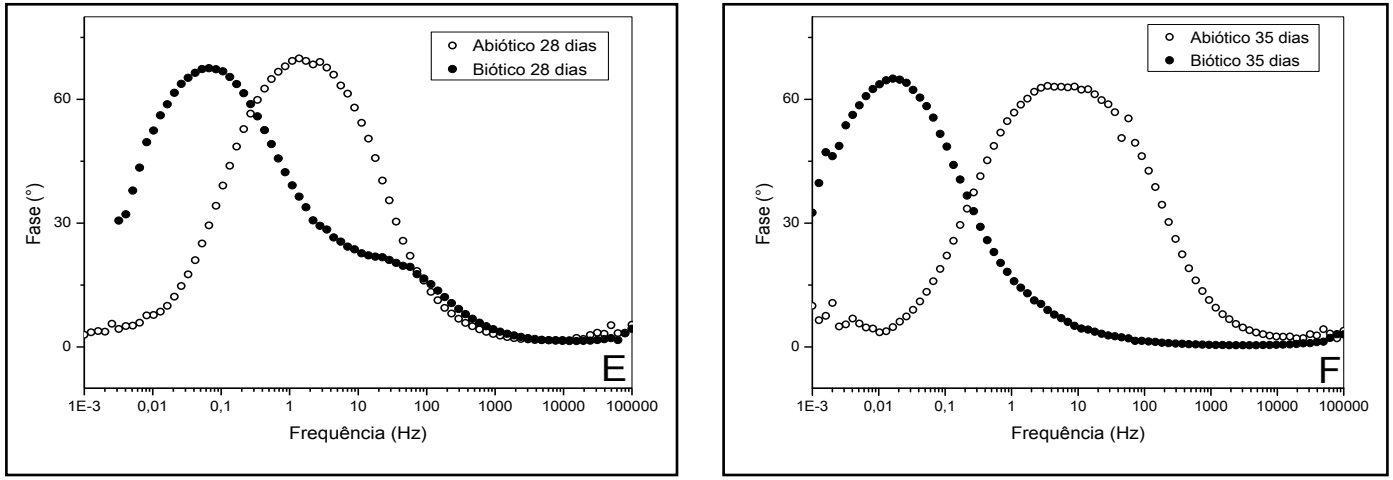


Figura 24 - Diagramas de Fase para o aço carbono1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias, na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Conclusão)



Fonte: O autor, 2015.

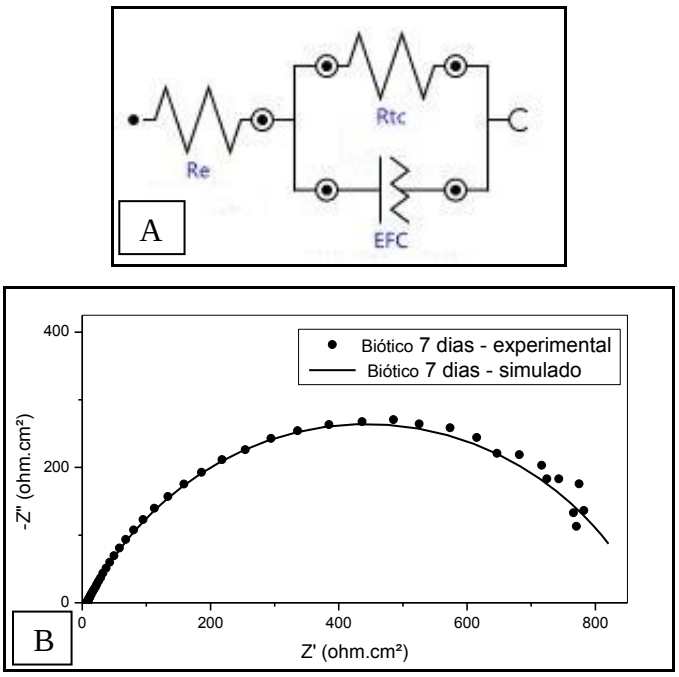
Observa-se, ao comparar os resultados de impedância eletroquímica dos ensaios abióticos com aqueles obtidos a partir de meios inoculados, que nos ensaios realizados nos corpos de prova expostos à presença de BRS, ocorreu uma significativa redução no tamanho do arco capacitivo, representado pelo diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist (Figura 22), para todos os tempos de ensaio, com exceção do ensaio no tempo zero (realizado após duas horas de imersão). Nesse último caso, um arco mais achatado pode ser visualizado, provavelmente correspondendo à formação de um filme não uniforme e poroso na superfície do material (BARCIA et al., 2002). Tais alterações no diagrama de Nyquist na presença de BRS indicam um decréscimo na resistência de transferência de carga e uma aceleração da corrosão do aço em meio contendo estes micro-organismos. Esse processo é geralmente relacionado com o metabolismo das BRS na superfície do aço, havendo a formação de biofilme, redução dos sulfatos e produção dos sulfetos (ou hidrogeno-sulfetos), e consequente, formação de camadas de sulfeto de ferro, com ataque localizado na superfície do material (ALABBAS et al., 2013; Xu et al., 2008).

Os gráficos de Bode (Figura 23) para os ensaios contendo BRS mostram uma redução no valor do módulo de Z e um deslocamento das curvas para valores de menor frequência, em comparação aos ensaios sem micro-organismos. Para a mesma comparação, os diagramas de fase da Figura 24, obtidos a partir de corpos de prova imersos em meios bióticos, mostram um deslocamento do valor máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência. Segundo Bhola et al.(2014), as alterações observadas nos gráficos de Bode e fase indicam uma corrosão do tipo localizada, favorecida pela formação de biofilme devido à colonização das BRS.

Os resultados de EIE podem ser melhor interpretados em termos de modelos de circuitos elétricos equivalentes, onde os dados referentes à resistência de transferência de carga (R_{tc}) e capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) são obtidos pela simulação do processo eletroquímico (CARVALHO e ANDRADE, 2006). Na presente dissertação, o circuito ilustrado na Figura 25A foi utilizado para simular todos os dados de impedância (tanto dos ensaios abióticos, quanto daqueles realizados em corpos de prova incubados em meio biótico), exceto o ensaio biótico com 28 dias. Nestes casos, considerou-se que a interface eletrodo/solução era composta pelo aço (provavelmente recoberto por uma fina camada porosa de um produto de corrosão ou do próprio biofilme) e o meio corrosivo (CASTANEDA e BENETTON, 2008). Assim, no circuito equivalente simples proposto na Figura 25A, R_e representa a resistência do eletrólito, R_{tc} é a resistência à transferência de carga, e EFC representa o elemento de fase constante, associado com a capacitância da dupla

camada elétrica (ALABBAS et al., 2013). O ajuste da simulação foi considerado bom para um valor de erro menor que 1% (BAYOUDH et al., 2008). A Figura 25B mostra um exemplo de uma condição simulada com o circuito da Figura 25A.

Figura 25 – A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para todas as condições, exceto o ensaio biótico 28 dias (R_e - resistência do eletrólito, R_{tc} - resistência à transferência de carga, EFC - elemento de fase constante); B: Exemplo de simulação usando o circuito proposto para o ensaio biótico com 7 dias

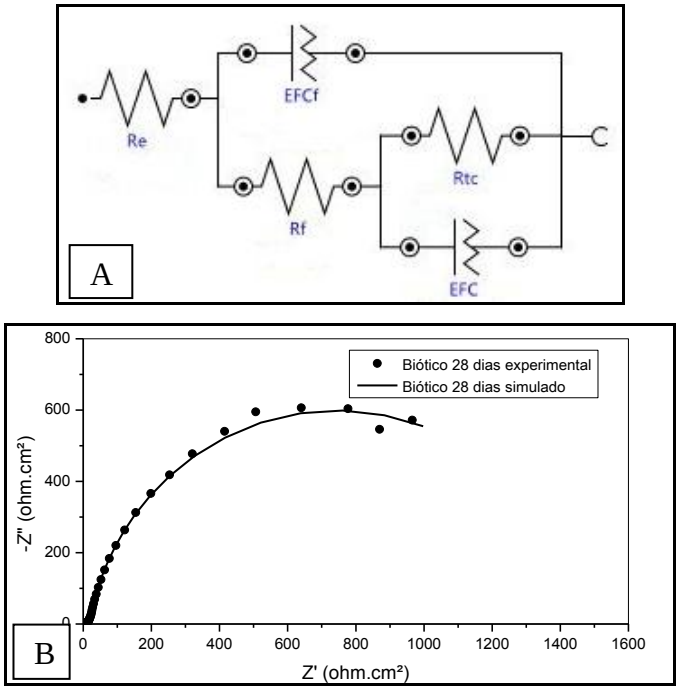


Fonte: O autor, 2015.

Para o corpo de prova incubado com BRS por 28 dias, porém, o circuito proposto não apresentou ajustes satisfatórios, mostrando que o processo observado nessa condição foi diferente dos demais. Ao se observar com cuidado os diagramas de Bode (Figura 23E) e, principalmente, de fase (Figura 24E), referentes aos ensaios em 28 dias contendo BRS, verifica-se a presença de mais de uma constante de tempo, o que pode ser relacionado com mais de um processo corrosivo (PÉREZ et al., 2007). Apesar desse comportamento não ser visualizado no diagrama de Nyquist para esta condição (Figura 22E) nota-se no diagrama de fase um primeiro máximo em altas frequências, possivelmente relacionado com a interface biofilme/solução, e um segundo máximo, em baixas frequências, em função da interface aço/biofilme. Devido a isto, para esta condição não foi possível a simulação dos dados de EIE

com o circuito simples apresentado na Figura 25A, sendo necessário o uso de outro modelo de circuito equivalente, ilustrado na Figura 26A. Esse circuito também foi usado por Alabbas et al. (2013), Duan et al. (2008) e Santana Rodríguez, Santana Hernández e González González (2006) para simular os dados de EIE no sistema biótico em seus estudos de corrosão do aço carbono por BRS. Nesse caso, R_f e EFC_f se referem à resistência e ao elemento de fase constante do biofilme, respectivamente. Do mesmo modo, o ajuste da simulação foi considerado bom para um valor de erro menor que 1% (BAYOUDH et al., 2008). A Figura 26B mostra esta condição simulada com o circuito da Figura 26A.

Figura 26 – A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para o ensaio biótico com 28 dias (R_e – resistência do eletrólito; R_f – resistência do filme; R_{tc} - resistência à transferência de carga; EFC - elemento de fase constante; EFC_f - elemento de fase constante do filme;). B: Simulação para o ensaio biótico com 28 dias utilizando o circuito proposto



Fonte: O autor, 2015.

A Tabela 8 mostra os valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE usando os circuitos equivalentes das Figuras 25A e 26A. Essa tabela também apresenta os valores de N, termo que define o grau de equivalência do elemento de fase constante para um componente capacitivo (CASTANEDA e BENETTON, 2008), bem como

os valores de R_f, C_{DCEf}, que são a resistência e capacitância da dupla camada elétrica do biofilme, respectivamente, obtidos para o ensaio biótico com 28 dias.

O valor de C_{DCE} apresentado na Tabela 8 foi calculado a partir da equação 2, apresentada na seção de Materiais e Métodos.

Tabela 8 - Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono em meio de água do mar sintética, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico), usando os circuitos equivalentes das Figuras 25A e 26A

	Ensaio Abiótico				Ensaio Biótico			
Tempo (dias)	R_e (Ω)	R_{tc} (Ω cm^2)	C_{DCE} (μF cm^{-2})	N	R_e (Ω)	R_{tc} (Ω cm^2)	C_{DCE} (μF cm^{-2})	N
0	4,86	895	8,06x10^{-4}	0,788	3,89	915	8,63x10^{-3}	0,773
7	4,92	952	1,29x10^{-3}	0,749	3,49	744	1,67x10^{-2}	0,711
14	6,09	805	1,49x10^{-3}	0,914	2,80	530	2,20x10^{-1}	0,664
21	5,90	961	2,04x10^{-3}	0,897	3,59	886	9,30x10^{-2}	0,769
28	4,89	1413	2,51x10^{-3}	0,880	5,90	980	4,73x10^{-3}	1,100
						R_f = 496	C_{DCEf}=2,50x10^{-2}	N_f=0,856
35	3,79	1307	9,08x10^{-4}	0,809	3,23	392	3,99x10^{-1}	0,846

Fonte: O autor, 2015.

Analisando os dados da Tabela 8, verifica-se que, para os ensaios realizados na ausência de BRS (ensaios abióticos), há uma irregular variação nos valores de R_{tc} entre zero e 14 dias de ensaio, provavelmente devido à formação e ao desprendimento de um produto de corrosão não estável na superfície do substrato. Contudo, um aumento de R_{tc} foi verificado para maiores tempos de ensaio, o que se reflete no tamanho do arco capacitivo observado nos diagramas de Nyquist da Figura 22. Isto ocorre, possivelmente, devido à formação de uma fina camada composta por uma mistura de substâncias presentes no próprio meio de cultura, bem como de produtos de corrosão. O aumento da espessura dessa camada após 21 dias de exposição pode conferir alguma proteção ao substrato, o que se reflete nos maiores valores de R_{tc}. Um pequeno decréscimo nesse parâmetro é notado após 35 dias de exposição, juntamente

com o decréscimo na resistência do eletrólito (R_e), indicando um aumento na condutividade no meio pela maior presença de íons (corrosão).

Um pequeno aumento nos valores de C_{DCE} foi observado para o ensaio abiótico a partir do 7° dia de exposição diminuindo, porém, para o 35° dia. Comparando os diagramas de fase na Figura 24 para os resultados dos ensaios abióticos, observa-se que os valores máximos dos ângulos de fase variam pouco (entre 60° e 70°) com o tempo de exposição. Nota-se também um pequeno deslocamento do valor máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência, o que pode ser relacionado com as pequenas variações em C_{DCE} observadas na Tabela 8. Esses resultados sugerem que houve formação de produtos de corrosão, os quais, provavelmente, não apresentavam elevada condutividade.

Em comparação aos ensaios abióticos, é possível observar na Tabela 8 que os valores de R_{tc} para o sistema ensaiado após imersão em meio contendo BRS foram, em sua maioria, menores do que aqueles obtidos para os corpos de prova ensaiados após exposição ao meio sem micro-organismos, em todos os tempos de ensaio realizados. Esse resultado confirma o que foi visto nas Figuras 22 a 24, mostrando que o processo corrosivo foi acelerado com o crescimento das BRS na superfície do corpo de prova (LIU et al., 2012). É interessante notar que houve um decréscimo nos valores de R_{tc} até 14 dias de exposição, seguido de um pequeno aumento no 21° dia de ensaio.

Os resultados da Figura 19 mostraram que não houve diferenças significativas no número de bactérias sésseis quantificadas entre 7 e 21 dias de ensaio, sendo obtidos as maiores concentrações de BRS aderidas no aço nesse período de ensaio. Assim, é possível supor que o decréscimo no valor de R_{tc} até 14 dias de exposição se deva aos metabólitos corrosivos produzidos pelas bactérias no biofilme. Esse fato, juntamente com os produtos de corrosão formados, pode ter promovido um aumento da espessura do biofilme no 21° dia de ensaio, o que conferiu certa proteção ao substrato, aumentando o R_{tc}. Após esse período, porém, o número de bactérias sésseis decresceu (Figura 19), expondo o substrato e favorecendo a corrosão. Nota-se também que, comparados aos ensaios abióticos, os valores de C_{DCE} aumentaram para os corpos de prova incubados na presença de BRS. Do mesmo modo como visto para R_{tc}, o crescimento de C_{DCE} com o tempo de exposição seguiu uma ordem irregular, dependendo da estabilidade do biofilme e do número de bactérias sésseis na superfície.

Os resultados de EIE concordam com aqueles obtidos por Nguyen et al. (2008) e Alabbas et al. (2013), segundo os quais, a diminuição de R_{tc} e o aumento de C_{DCE} indicam que os produtos gerados pelas BRS, tais como SPE e íons sulfetos, podem ser adsorvidos na

superfície do aço alterando, em conjunto com os produtos de corrosão, as propriedades eletroquímicas da interface metal/solução, tornando a superfície do metal mais propícia a corroer.

3.1.3.3 Polarização Potenciodinâmica

As curvas de polarização potenciodinâmica, catódicas e anódicas, apresentadas na Figura 27, foram obtidas para os corpos de prova de aço, em meio de água do mar sintética. Estes corpos de prova foram previamente incubados no meio de cultura, na ausência (abiótico) e na presença de BRS (biótico, em diferentes tempos de ensaio. A Tabela 9 mostra os principais parâmetros eletroquímicos, tais como, potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), os coeficientes de Tafel, anódico (β_a) e catódico(β_c) e também a taxa de corrosão. Estes parâmetros foram obtidos através da extrapolação das retas de Tafel.

A Figura 27 mostra que os perfis das curvas de polarização obtidas a partir de corpos de prova previamente incubados em meio sem micro-organismo (ensaios abióticos) não apresentaram variações significativas, sugerindo que os processos anódicos e catódicos nessas condições não mudaram significativamente com o tempo de exposição. Isso pode ser confirmado pelos valores dos coeficientes de Tafel β_a e β_c apresentados na Tabela 9, já que estes variaram pouco nos diferentes tempos de ensaio. Nesses casos, a Tabela 9 também não mostra variações significativas nos valores de I_{corr} ou E_{corr}, bem como na taxa de corrosão.

Figura 27 - Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias,na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Continua)

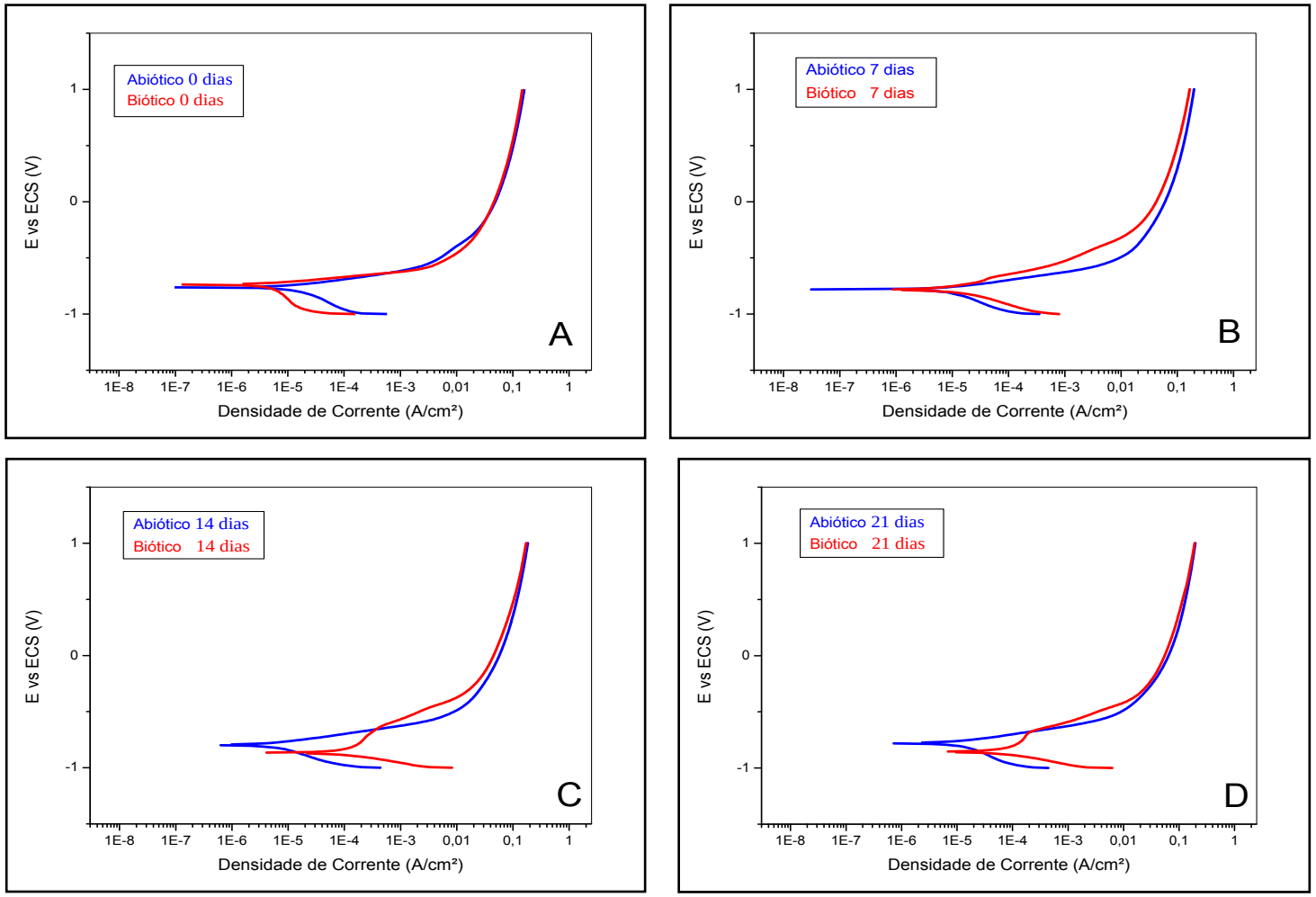
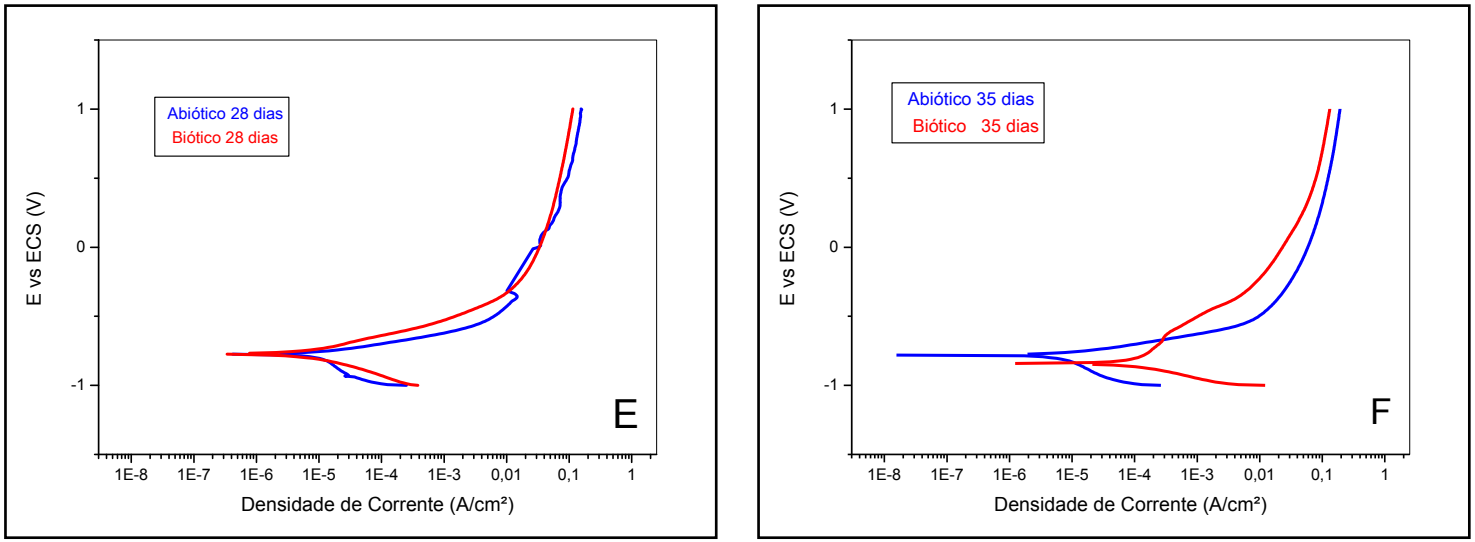


Figura 27 - Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética - condição de ensaio: (A) tempo zero (duas horas de imersão); (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias,na ausência (abiótico) e presença de BRS (biótico) (Conclusão)



Fonte: O autor, 2015.

Tabela 9 - Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para todas as condições de ensaio, abióticos e bióticos

Ensaio Abiótico						Ensaio Biótico			
Tempo (dias)	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm^2)	β_a (V/dec)	β_c (V/dec)	Taxa $_{corr}$ (mm/ano)	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm^2)	β_a (V/dec)	Taxa $_{corr}$ (mm/ano)
0	-0,74	$2,83x10^{-6}$	0,053	0,145	$6,46x10^{-2}$	-0,75	$1,47x10^{-6}$	0,042	$3,19x10^{-2}$
7	-0,78	$2,45x10^{-6}$	0,055	0,123	$5,70x10^{-2}$	-0,78	$2,24x10^{-6}$	0,074	$5,37x10^{-2}$
14	-0,79	$1,36x10^{-6}$	0,060	0,101	$3,16x10^{-2}$	-0,87	$2,45x10^{-5}$	0,130	$5,69x10^{-1}$
21	-0,77	$3,48x10^{-6}$	0,057	0,122	$8,10x10^{-2}$	-0,86	$2,09x10^{-5}$	0,129	$4,88x10^{-1}$
28	-0,77	$2,78x10^{-6}$	0,057	0,150	$6,26x10^{-2}$	-0,85	$1,55x10^{-5}$	0,125	$3,59x10^{-1}$
35	-0,78	$1,57x10^{-6}$	0,050	0,100	$3,65x10^{-2}$	-0,84	$2,35x10^{-5}$	0,123	$5,46x10^{-1}$

Fonte: O autor, 2015.

Os resultados de polarização potenciodinâmica são semelhantes ao obtido para os ensaios de EIE, apesar destes não seguirem uma tendência regular, mantendo variações entre os valores encontrados para R_{tc} e C_{DCE} quando comparados com I_{corr} nos diferentes tempos de ensaio. Assim como os valores de C_{DCE} nos ensaios de EIE, os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão variaram pouco para o corpo de prova incubado em meio sem micro-organismo, evidenciando uma menor corrosão nesta condição de ensaio.

Para os perfis das curvas de polarização obtidas a partir dos corpos de prova previamente incubados em meio contendo BRS também não ocorreram diferenças significativas entre os tempos de ensaio (com exceção do ensaio no tempo zero, com duas horas de imersão), conforme observado na Figura 27 e também nos valores obtidos para os coeficientes de Tafel β_a e β_c exibidos na Tabela 9. Porém, comparando com o ensaio abiótico, verifica-se que houve uma variação mais acentuada nos valores de β_a e de β_c, sugerindo que os micro-organismos presentes no meio de incubação causaram alterações em ambas as semi-reações eletroquímicas, catódicas e anódicas, acelerando o processo de corrosão do aço (PAULA, 2010). Esse resultado indica que, nas condições do presente estudo, o principal processo anódico na presença de BRS pode ser a formação do biofilme e de produtos de corrosão pouco estáveis na superfície do aço. Por outro lado, as variações catódicas podem ter

ocorrido com base na despolarização catódica e também com a presença de sulfetos redutores na superfície do aço (DUAN, et al, 2008). Nessa condição de ensaio, observa-se ainda um deslocamento das curvas de polarização para maiores valores de densidade de corrente, gerando maiores valores de I_{corr} e uma tendência do deslocamento de E_{corr} para valores mais negativos, conforme verificado na Tabela 9. Estes resultados confirmam que as BRS favorecem a corrosão do aço no meio estudado.

Os resultados obtidos a partir das curvas de polarização são semelhantes às tendências verificadas para os ensaios de EIE. Um aumento de I_{corr} foi observado até 14 dias de ensaio, seguido por uma pequena redução em 21 e 28 dias e novamente aumentou em 35 dias, tal como o comportamento evidenciado para os valores de R_{tc} e C_{DCE} nos ensaios de EIE.Os maiores valores de densidade de corrente de corrosão apresentados na Tabela 9 foram obtidos para o corpo de prova incubado com BRS, após 14 e 35 dias de imersão. Este resultado concorda com aqueles obtidos nos ensaios de EIE, em que os ensaios com 14 e 35 dias apresentaram os menores valores de R_{tc} e maiores valores de C_{DCE}, em função dos metabólitos corrosivos produzidos e da formação de produtos de corrosão nessas condições, sugerindo aceleração da corrosão nestes tempos de ensaio.

Os resultados obtidos pelos ensaios de polarização potenciodinâmica na presente dissertação confirmam o efeito corrosivo das BRS no aço carbono 1020. A atividade metabólica destas bactérias na superfície do aço gera biofilme e produtos de corrosão que contribuem para a aceleração do processo corrosivo.

3.2 Ensaios com biocidas aplicados antes da formação do biofilme

O uso de biocidas é necessário para tentar impedir ou reduzir o crescimento dos micro-organismos envolvidos na corrosão microbiológica. Porém, a maioria dos biocidas comerciais empregados possui a desvantagem de serem tóxicos, causando danos ao meio ambiente. Por isso, no presente trabalho foi avaliada a ação de um biocida natural, o óleo de alho ainda não estudado em casos de corrosão por BRS, em comparação com um biocida comercial, o glutaraldeído, efetivo no controle de BRS, porém bastante tóxico.

Nessa parte da dissertação, os biocidas foram aplicados *in situ* ao meio de cultura contendo BRS e os corpos de prova de aço, sendo incubados por 7 dias para o crescimento dos micro-organismos sobre a superfície do aço. Esse tempo de incubação foi escolhido por ser o menor tempo em que se observou maior crescimento de BRS séssil. Estes ensaios tiveram como objetivo verificar a capacidade dos produtos estudados de evitar ou dificultar a formação de biofilme na superfície do aço.

Os resultados destes experimentos serão apresentados em termos de crescimento microbiano, análise de MEV e ensaios eletroquímicos sempre comparados com aqueles encontrados para o corpo de prova incubado por 7 dias em meio de cultura contendo BRS, mas sem biocidas, sendo denominado de “controle”.

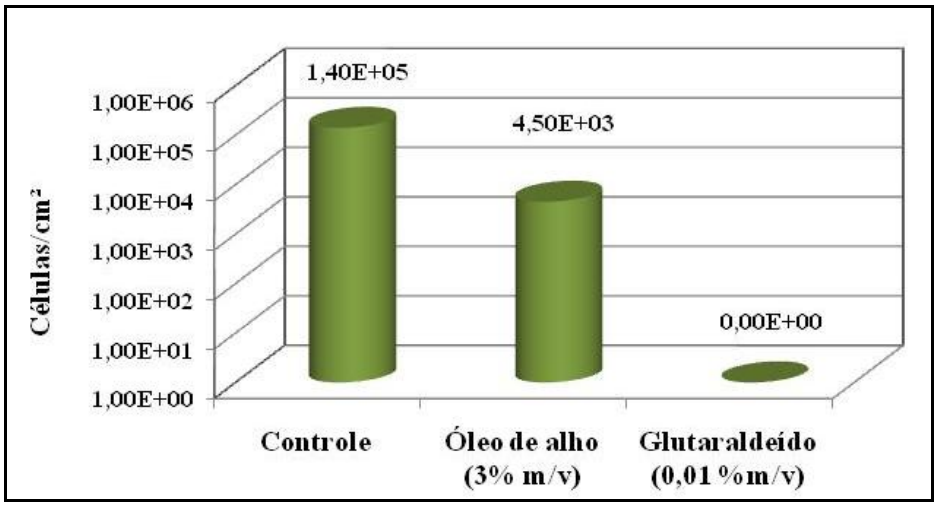
3.2.1 Avaliação do crescimento microbiano

A quantificação microbiana para as células de BRS sésseis, obtida a partir da técnica do NMP, para os ensaios com biocidas aplicados antes da formação de biofilme com tempo de incubação de 7 dias, em comparação com o ensaio controle, está apresentada na Figura 28.

Em comparação com o ensaio controle, a presença dos compostos estudados no meio de crescimento diminuiu a quantidade de células sésseis no substrato de aço, indicando que ambos podem ser aplicados como biocidas. Contudo, resultados diferentes foram obtidos para

o produto comercial (glutaraldeído) e aquele proposto como “biocida verde” (óleo de alho). Para o glutaraldeído não foi observado crescimento de células sésseis de BRS. Já para o óleo de alho, a população de BRS sésseis foi de 4,5x10³ células/cm², correspondendo a 30% de redução.

Figura 28 - Quantificação microbiana de células de BRS sésseis para os ensaios com biocidas, aplicados antes da formação do biofilme, e para o ensaio controle



Fonte: O autor, 2015.

Apesar de altamente eficiente, o biocida glutaraldeído é tóxico ao meio ambiente, principalmente para ecossistemas aquáticos (LEUNG, 2001; SANO et al, 2005; PEREIRA et al., 2014). Desse modo, é necessário o emprego da menor concentração possível desse reagente para impedir o crescimento dos micro-organismos. Contudo, esse valor mínimo varia, dependendo se as células de BRS quantificadas são sésseis ou planctônicas, bem como o tempo de contato de atuação do biocida com o micro-organismo. Porém, a literatura concorda que as células sésseis são sempre mais difíceis de remover e exigem maiores concentrações de glutaraldeído (GARDNER e STEWART, 2002; LAVANIA et al., 2011; STRUCHTEMEYER et al., 2012; OCANDO et al., 2013).

Segundo Struchtemeyer et al. (2012), a concentração mínima de glutaraldeído necessária para inibir o crescimento das células sésseis de uma cultura pura de *D. desulfuricans* e de uma cultura enriquecida de BRS, foi de 200 mg L^{-1} para as ambas culturas,

para um tempo de contato de 28 dias. Os resultados encontrados por Gardner e Stewart (2002) mostraram que, para as células sésseis, uma concentração de 500 mg L^{-1} foi necessária para retardar a recuperação de biofilme em mais ou menos 3 dias. Já Lavania et al. (2011) mostraram que a concentração de 100 mg L^{-1} de glutaraldeído, em um tratamento contínuo por 90 dias, foi ineficiente no controle de células de *D. vulgaris* e *D. gigas*, não havendo redução significativa no crescimento das células sésseis. Na presente dissertação, a concentração de 0,01 % m/v (100 mg L^{-1}) do biocida comercial durante 7 dias de imersão foi suficiente para inibir o crescimento e desenvolvimento das BRS na superfície metálica, impedindo assim a formação de biofilme.

As variações encontradas na literatura entre concentração e tempo de contato, necessários para inibir o crescimento destes micro-organismos, podem estar relacionadas às diferentes espécies de BRS estudadas, as quais podem reagir de forma diferente à ação de um mesmo biocida, aplicado em uma mesma concentração e pelo mesmo tempo. Sheng, Ting e Pehkonen (2007) constataram esse efeito para o biocida 2-metil benzimidazol (MBI), aplicado no controle de células de *D. singaporenus* e *D. desulfuricans*. O produto testado foi mais eficaz para *D. desulfuricans*, devido ao fato da espécie *D. singaporenus* excretar maior quantidade de SPE, conferindo proteção extra à célula e resistindo à ação do biocida.

Os compostos extraídos do alho são bastante conhecidos por suas características antimicrobianas e bactericidas (BENKEBLIA, 2004; CAÑIZARES et al., 2004; ZALEPUGIN et al., 2010) e por suas propriedades antioxidantes e de inibição de corrosão (PEREIRA et al., 2012; AFIA et al. 2014). Porém, até o momento, não existem trabalhos na literatura que discutam a ação do alho e seus compostos no controle do crescimento das BRS. Estudos realizados com outros produtos naturais, tais como extrato de folhas de Nim (OCANDO et al., 2013), mostraram excelente atuação biocida, retardando a formação do biofilme por 60h. Contudo, os autores verificaram perda de efetividade do produto após aproximadamente 72h de incubação, resultando inclusive em uma quantidade maior de células sésseis do que a observada no meio sem biocida, após 120h de ensaio.

Nos resultados do presente estudo, o óleo de alho aplicado no meio conseguiu, ao fim de 7 dias de incubação, reduzir o crescimento da população de células de BRS aderidas ao substrato em quase 2 ordens de grandeza, indicando seu potencial uso como agente biocida natural para as BRS. Apesar das pesquisas sobre a ação antimicróbica do alho ainda estarem

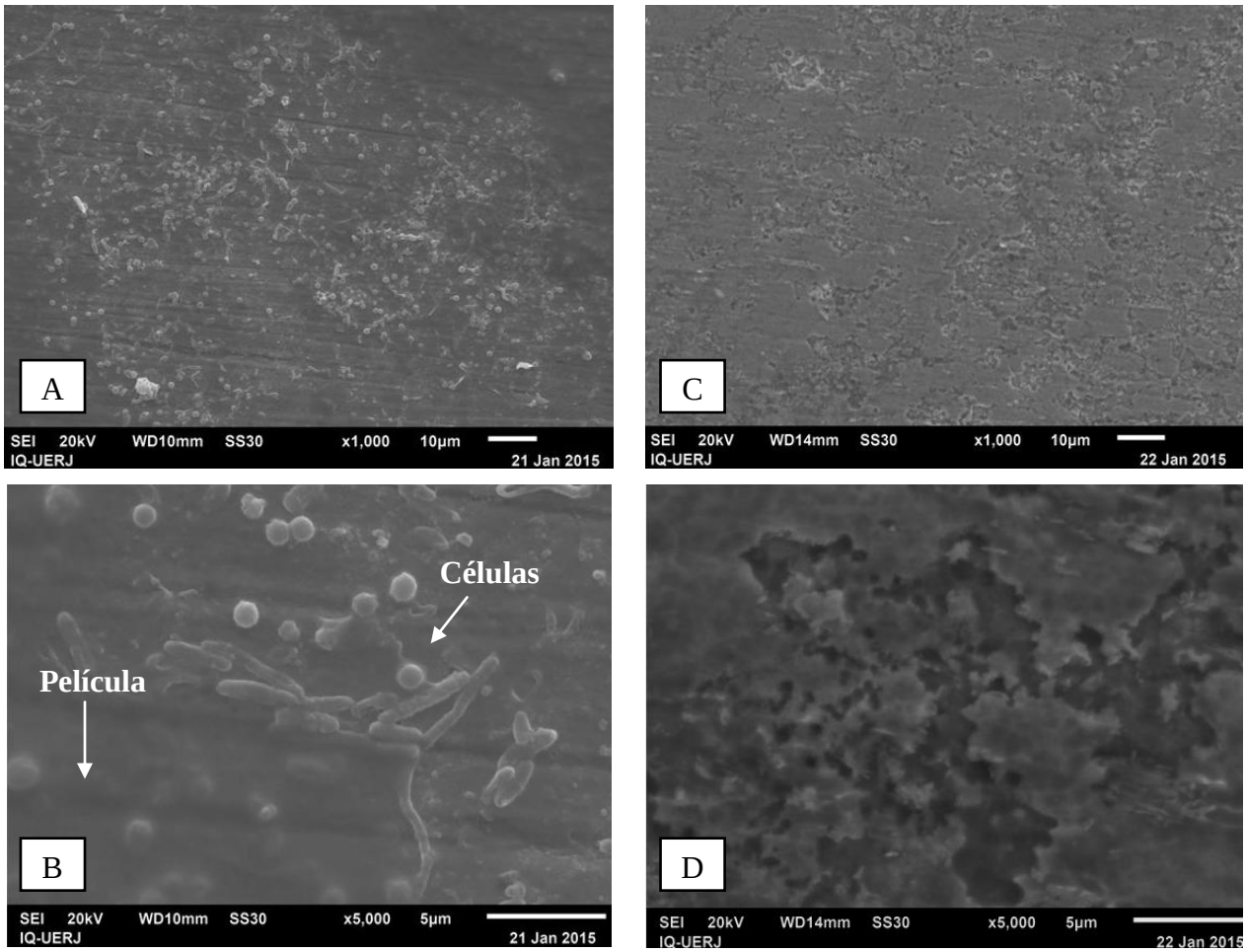
em andamento, acredita-se que sua atividade esteja relacionada com o efeito de alguns de seus compostos, como alicina, dissulfeto de dialila ou trissulfeto de dialila, devido suas ações bacteriostáticas e bactericidas (ZALEPUGIN et al., 2010). É importante lembrar, contudo, que este produto mostrou-se bem menos eficiente do que o glutaraldeído durante o mesmo tempo de experimento, embora tenha sido utilizado em maior concentração. Além disso, muitos componentes específicos do alho são termicamente instáveis. Portanto, como o processo de incubação foi realizado a 30°C por 7 dias, é possível que tenha ocorrido degradação desses componentes diminuindo a ação do produto.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias apresentadas nas Figuras 29 e 30 foram obtidas após 7 dias de imersão do corpo de prova em meio contendo BRS juntamente com os biocidas, óleo de alho ou glutaraldeído, a fim de dificultar a formação do biofilme. São também mostradas micrografias realizadas após a remoção do biofilme, visando verificar a condição final do aço.

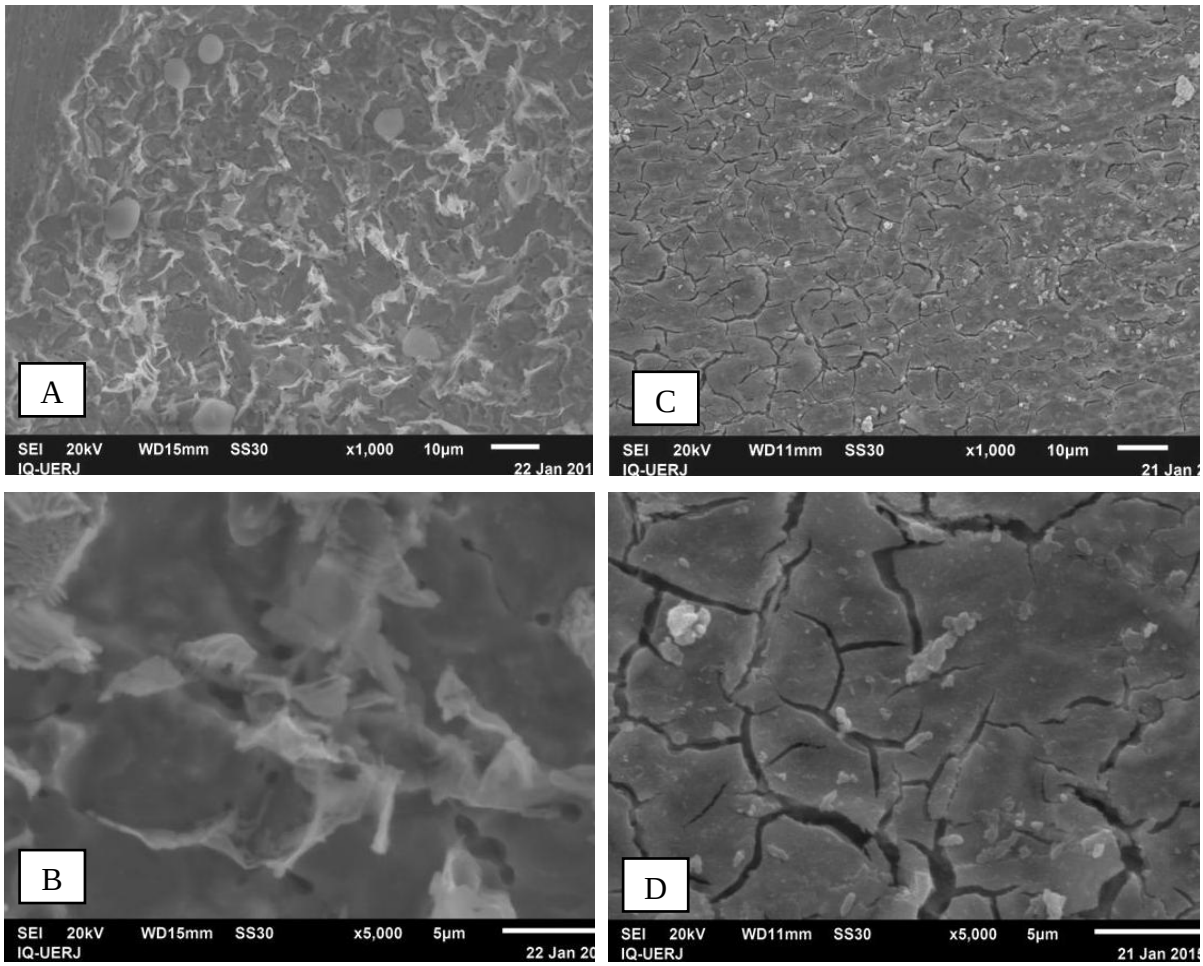
A Figura 29A mostra a superfície do aço carbono após 7 dias de experimento com a adição do óleo de alho no momento da inoculação do mesmo com a BRS, sendo possível verificar a formação de um aglomerado celular, mesmo com a adição do biocida proposto. Na imagem com maior ampliação (Figura 29B) observa-se a presença de células na forma de cocos e bacilos, embora também haja, aparentemente, uma película recobrindo o substrato, provavelmente formado por compostos do alho, os quais têm conhecida ação como inibidor de corrosão (AFIA et al., 2014; PEREIRA et al., 2012). Esses resultados sugerem que o efeito de 30% de redução na quantificação das bactérias sésseis, verificado nas condições do ensaio com o óleo de alho (Figura 28), também pode ser resultante de uma dificuldade de ancoragem e proliferação das BRS na superfície do aço, em função da adsorção prévia destes compostos de alho, dificultando a formação do biofilme.

Figura 29 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 incubado em meio contendo óleo de alho por 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme, com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

Figura 30 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 incubado em meio contendo glutaraldeído por 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X (C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

Após a remoção do biofilme (Figuras 29C e 29D), o aspecto observado para a superfície do aço foi diferente daquele obtido sem a adição de biocidas (Figuras 20C e 20D), uma vez que não se verificou corrosão localiza por pites, mas sim uma corrosão uniforme na superfície. Esse resultado indica que o óleo de alho, apesar de ter inibido apenas parcialmente o crescimento das BRS durante todo o período de ensaio, pode ter reduzido o processo corrosivo do aço no meio estudado por ter agido também como um inibidor natural de corrosão.

Na Figura 30A pode-se observar a superfície do aço carbono após 7 dias de experimento com a adição simultânea do inóculo de BRS e glutaraldeído, *sendo* possível notar a formação de um filme e de poucos aglomerados. Lavania et al. (2011) também observaram a formação de células na superfície do aço tratada com 100 mg L^{-1} de glutaraldeído. Quando a imagem foi ampliada (Figura 30B) foi possível ver que esse filme era pouco aderente à superfície do aço. Embora existam diferenças quanto à concentração necessária de glutaraldeído para inibir a formação de biofilmes, conforme discutido anteriormente nesse texto, esse resultado está próximo do esperado, já que não foi observado crescimento de BRS na presença de glutaraldeído (Figura 28). Isso confirma a capacidade do glutaraldeído em inibir a atividade superficial de BRS.

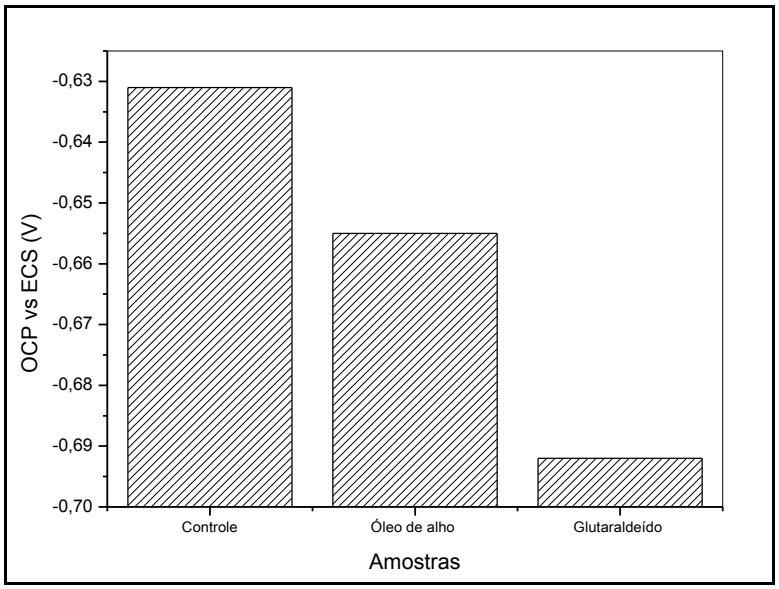
Após a remoção do biofilme (Figuras 30C e 30D) foi possível observar a presença de pequenos particulados na superfície, que podem ser produtos de corrosão. Além disso, a superfície estava trincada, provavelmente resultante de outras formas de corrosão do aço no meio estudado, decorrente das condições de realização do presente estudo, isto é, elevada concentração do glutaraldeído sob incubação a 30°C por 7 dias.

3.2.3 Ensaios eletroquímicos

3.2.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 31 exibe a variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, em meio de água do mar sintética, para a condição de ensaio com a adição simultânea do inóculo de BRS e os biocidas, portanto antes da formação de biofilme.

Figura 31 - Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética



Fonte: O autor, 2015.

A análise da figura revela que para os ensaios realizados com aplicação de biocidas houve um deslocamento do potencial de circuito aberto para valores mais negativos. Para o óleo de alho o potencial atingiu o valor de -0,655 V e para o glutaraldeído -0,692 V.

Conforme discutido no item 3.1.3.1 dessa dissertação, a formação do biofilme desloca os valores dos potenciais de circuito aberto do aço para valores mais positivos, essa variação de potenciais é conhecida na literatura como “enobrecimento” (LITTLE, LEE e RAY, 2008; ALABBAS et al., 2013; BHOLA et al., 2014). Analisando os resultados da Figura 31, a adição de biocidas no momento da incubação evitou que ocorresse o fenômeno de “enobrecimento” na superfície do aço, indicando redução ou ausência de colonização de micro-organismos na superfície metálica. Esses resultados, portanto, concordam com aqueles obtidos na quantificação microbiana, inclusive no que concerne à eficiência dos biocidas. Para efeito de comparação, o potencial de circuito aberto do aço incubado por sete dias em meio sem BRS é aproximadamente -0,720 V, próximo do valor encontrado para o ensaio com glutaraldeído (-0,692 V).

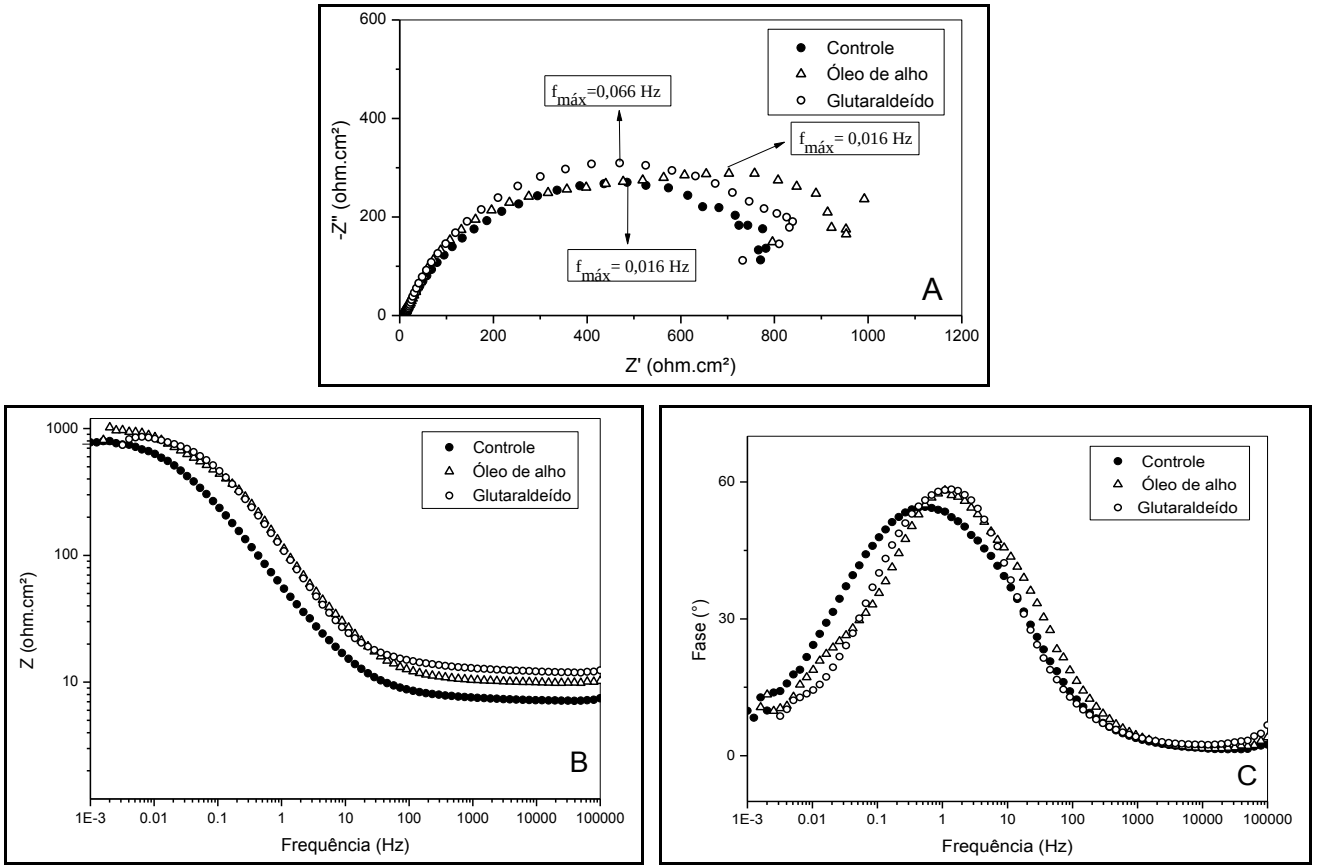
3.2.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Os diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, são apresentados na Figura 32. Os corpos de prova foram incubados no meio de cultura contendo BRS e os biocidas estudados.

Na Figura 32A pode-se observar um aumento no tamanho dos arcos capacitivos no diagrama de Nyquist para os ensaios realizados com a adição prévia dos biocidas, em comparação ao ensaio na ausência destes (controle). Esse aumento nos arcos capacitivos sugere que ambos os biocidas, por diminuírem a quantidade de células sésseis na superfície, reduziram também o processo de corrosão do aço carbono. É interessante notar que o arco capacitivo para o aço em meio contendo o óleo de alho apresentou maior diâmetro do que aquele observado em meio contendo glutaraldeído, apesar do óleo de alho não ter inibido completamente o crescimento das BRS. Conforme mencionado, os compostos extraídos do alho, seja como óleo ou como extrato aquoso de sua casca, têm conhecida ação como inibidor de corrosão (PEREIRA et al., 2012; AFIA et al., 2014). Logo, os resultados obtidos se devem, provavelmente, não apenas pela ação biocida destes compostos, mas também pela formação da película inibidora de corrosão, que se aderiu à superfície do aço, conforme verificado nas Figuras 29A e 29B, protegendo o metal da corrosão.

No gráfico de Bode, Figura 32B, observa-se um aumento nos valores de módulo de Z para os ensaios com biocidas, quando comparado ao ensaio controle, embora não haja diferenças entre a ação dos dois biocidas. Adicionalmente, no diagrama de fase da Figura 32C, pode ser notado um ligeiro deslocamento do ângulo de fase para maiores valores de frequências. Estes resultados sugerem, portanto, um efeito de redução da corrosão por BRS, através da adição dos biocidas.

Figura 32 - Diagramas de Nyquist (A), Bode (B) e Fase (C) para o aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética



Fonte: O autor, 2015.

Os resultados de EIE para os ensaios com biocidas, aplicados antes da formação do biofilme, também foram simulados com o mesmo modelo de circuito simples anteriormente apresentado na Figura 25A. Os valores de R_{tc} e de C_{DCE}, obtidos após a simulação dos dados de EIE, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE para o aço carbono 1020, previamente incubado em meio contendo BRS e os biocidas estudados, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente da Figura 25A

	R_e (Ω)	R_{tc} (Ω cm²)	C_{DCE} (μF cm $^{-2}$)	N
Controle	3,49	744	$1,67x10^{-2}$	0,711
Óleo de alho	4,43	900	$4,76x10^{-3}$	0,723
Glutaraldeído	6,41	803	$6,43x10^{-3}$	0,781

Fonte: O autor, 2015.

Pode ser observado na Tabela 10 que, comparado com o ensaio controle, os valores de R_{tc} aumentaram e os valores de C_{DCE} diminuíram na presença dos biocidas, comprovando que o processo corrosivo foi reduzido nessas condições. Os valores obtidos para ambos os parâmetros estão próximos daqueles verificados para os ensaios com aço incubado na ausência de micro-organismos (ensaio abiótico, Tabela 8). O maior valor de R_{tc} e menor valor de C_{DCE} foram obtidos para o ensaio na presença de óleo de alho, confirmando o que foi visto nos diagramas de EIE da Figura 32 e sendo relacionado ao somatório do efeito biocida com o efeito de inibição de corrosão desse produto, conforme discutido anteriormente.

Para o ensaio realizado com o biocida glutaraldeído, os valores de R_{tc} e de C_{DCE} também aumentaram e diminuíram, respectivamente, quando comparados aos valores de R_{tc} e de C_{DCE} encontrados para o ensaio controle, demonstrando que o processo corrosivo também foi reduzido. Nesse caso, porém, a redução da corrosão ocorreu apenas devido à inibição do crescimento das BRS.

É importante ressaltar que o decréscimo de C_{DCE} e o deslocamento dos ângulos de fase para maiores valores de frequência, com ambos os biocidas, podem ser relacionados com a

não formação de biofilme e com a presença de um produto de corrosão (ou filme/película protetor) pouco condutor na superfície do aço, o que dificultou o processo de transferência de carga (BAYOUDH et al., 2008).

3.2.3.3 Polarização Potenciodinâmica

A Figura 33A apresenta as curvas de polarização potenciodinâmica catódicas e anódicas em toda a faixa de potencial estudado (-1 a +1 V), para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, nos ensaios em que os biocidas testados foram aplicados antes da formação do biofilme. A Figura 33B mostra essas curvas ampliadas na região em que é válida a análise de Tafel, para melhor visualização. Os principais parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel, tais como o potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), os coeficientes de Tafel anódico (β_a) e catódico (β_c), e também a taxa de corrosão ($taxa_{corr}$) são mostrados na Tabela 11.

Figura 33 – A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme. B: Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel (Continua)

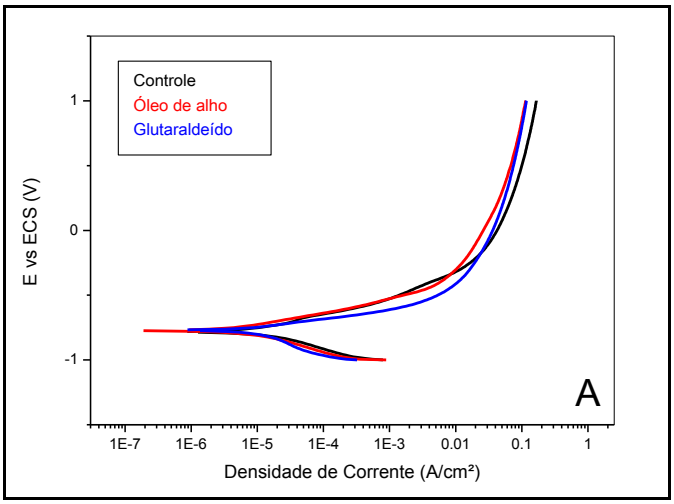
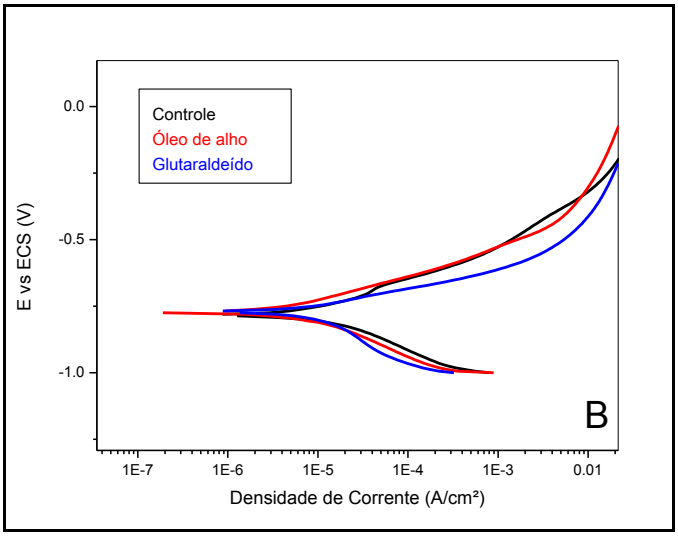


Figura 33 – A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme. B: Ampliação das curvas na região de Tafel (Conclusão)



Fonte: O autor, 2015.

Tabela 11 - Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme

	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm^2)	β_a (V/dec)	β_c (V/dec)	$Taxa_{corr}$ (mm/ano)
Controle	-0,78	$2,24x10^{-6}$	0,074	0,077	$5,37x10^{-2}$
Óleo de alho	-0,77	$1,06x10^{-6}$	0,068	0,068	$2,64x10^{-2}$
Glutaraldeído	-0,77	$2,32x10^{-6}$	0,066	0,092	$5,40x10^{-2}$

Fonte: O autor, 2015.

Observa-se nas Figuras 33A e 33B que as curvas de polarização dos ensaios com biocidas não se comportaram de modo muito diferente daquelas obtidas para a condição controle. Embora haja apenas uma pequena variação das constantes de Tafel apresentadas na Tabela 11, o decréscimo dos valores de β_a com a adição dos biocidas sugere que ambos atuam no ramo catódico, embora os valores obtidos ainda estejam distantes daquele verificado para o

aço nu incubado por 7 dias sem BRS (β_a = 0,055 V/dec). Contudo, apenas o glutaraldeído pareceu afetar a reação catódica, aumentando β_c para valores razoavelmente próximos àqueles observados para o aço incubado em meio sem micro-organismo, conforme verificado na Tabela 9. Desse modo, o biocida glutaraldeído pode também evitar ou diminuir o processo da despolarização catódica e/ou a formação de sulfetos que favoreçam as reações de redução na superfície do aço (DUAN et al., 2008).

No ensaio realizado na presença de óleo de alho o deslocamento de E_{corr} para um valor mais positivo não foi significativo, porém ocorreu um pequeno decréscimo nos valores de I_{corr}, bem como da taxa de corrosão, sugerindo que este biocida dificultou a formação do biofilme e/ou de produto de corrosão instável. Este resultado pode ser explicado por sua ação biocida e pela formação de uma película superficial, a qual atua modificando a reação de dissolução do metal, retardando a corrosão (PEREIRA et al., 2012). Este mesmo comportamento foi verificado na presença do glutaraldeído em relação à variação do E_{corr} do aço. Porém, nesse caso, os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão aumentaram ligeiramente em relação à condição controle, provavelmente porque o glutaraldeído não tem efeito de inibidor de corrosão, como acontece com o óleo de alho. Esse fato pode estar relacionado com as trincas superficiais observadas por microscopia (Figuras 30C e 30D). Assim, a contribuição para a diminuição do processo corrosivo com a adição deste biocida ao meio de cultura foi apenas pela inibição do crescimento das BRS, o que impediu a formação de um biofilme na superfície.

Os resultados obtidos a partir das curvas de polarização não confirmam totalmente as tendências verificadas para os ensaios de EIE. Isso pode indicar que a ação dos biocidas no processo de corrosão microbiológica do aço, quando estes são inseridos antes da formação do biofilme, pode depender do potencial aplicado. Nos ensaios de EIE, o eletrodo está em potencial de circuito aberto, enquanto que o I_{corr} é determinado pela extrapolação de Tafel, a partir de curvas de polarização obtidas de experimentos em que os eletrodos estão polarizados.

3.3 Ensaios com biocidas aplicados após a formação do biofilme

Em muitas ocasiões, não é possível aplicar o biocida antes de notar que a CMI ocorreu. Ainda assim, é necessário o uso de biocidas para evitar que maior degradação do material ocorra. Desse modo, serão agora apresentados os resultados de crescimento microbiano, análise de MEV e ensaios eletroquímicos, obtidos para os ensaios realizados com a aplicação de biocidas depois de formado o biofilme, por dois tempos de contato 24h e 7 dias. A água do mar foi utilizada em substituição ao meio de cultura para simular um meio isento de fonte de carbono.

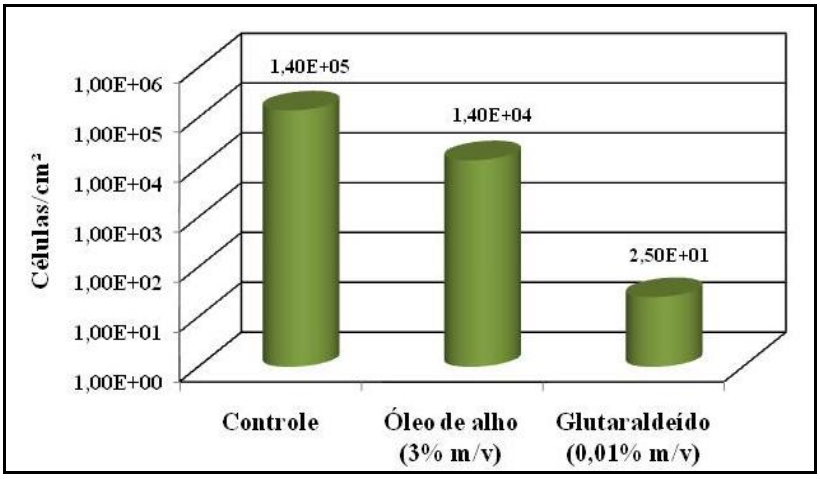
3.3.1 Tempo de contato de 24 horas

3.3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano

A quantificação microbiana para BRS sésseis, obtida através da técnica do NMP, para os ensaios com biocidas aplicados após a formação de biofilme por um tempo de contato de 24 horas, em comparação com o ensaio controle, está apresentada na Figura 34.

Os estudos realizados com a aplicação do óleo de alho à água do mar, onde estava imerso o aço com biofilme já formado, por um tempo de contato de 24 horas, reduziu a população de BRS em uma ordem de grandeza (19%), demonstrando um baixo efeito bactericida. Considerando que a atuação do óleo de alho na redução das células sésseis de BRS envolve também a adsorção superficial de seus compostos sobre o metal, os resultados sugerem que a adsorção destes compostos sobre o biofilme já formado não teriam o mesmo efeito verificado anteriormente (Ensaios com biocidas aplicados antes da formação do biofilme).

Figura 34 - Quantificação microbiana para ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas



Fonte: O autor, 2015.

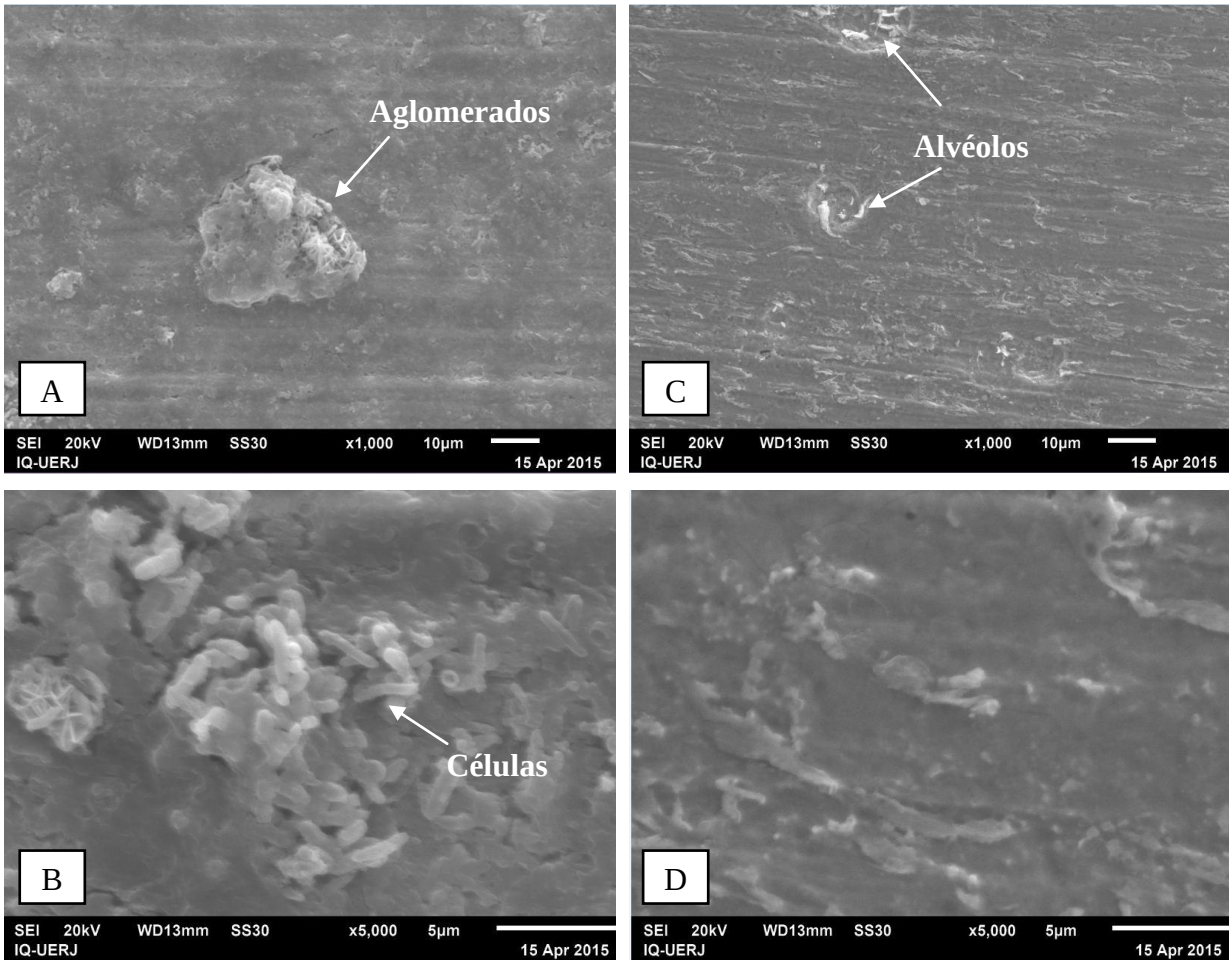
Já o glutaraldeído apresentou uma redução de 73% da população de BRS, confirmando a eficácia deste biocida em eliminar células de BRS já estabelecidas em um biofilme. Rège e Sand (1998) utilizaram glutaraldeído, também na concentração de 100 mg L^{-1} e tempo de contato de 24h, no tratamento de biofilmes de BRS já estabelecidos. Porém, nas condições do estudo desses autores, em que os biocidas foram aplicados em biofilmes formados de 10 semanas, a população bacteriana só foi reduzida em 30%. Melhores resultados só foram encontrados quando os autores utilizaram uma maior concentração, 500 mg L^{-1}, por um tempo de contato de 7 dias. Mais uma vez, a diferença pode ser provavelmente explicada pela espécie de BRS estudada (SHENG, TING e PEHKONEN, 2007).

3.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias apresentadas nas Figuras 35 e 36 foram obtidas para a condição de ensaio em que os biocidas foram aplicados depois de formado o biofilme, em um tempo de

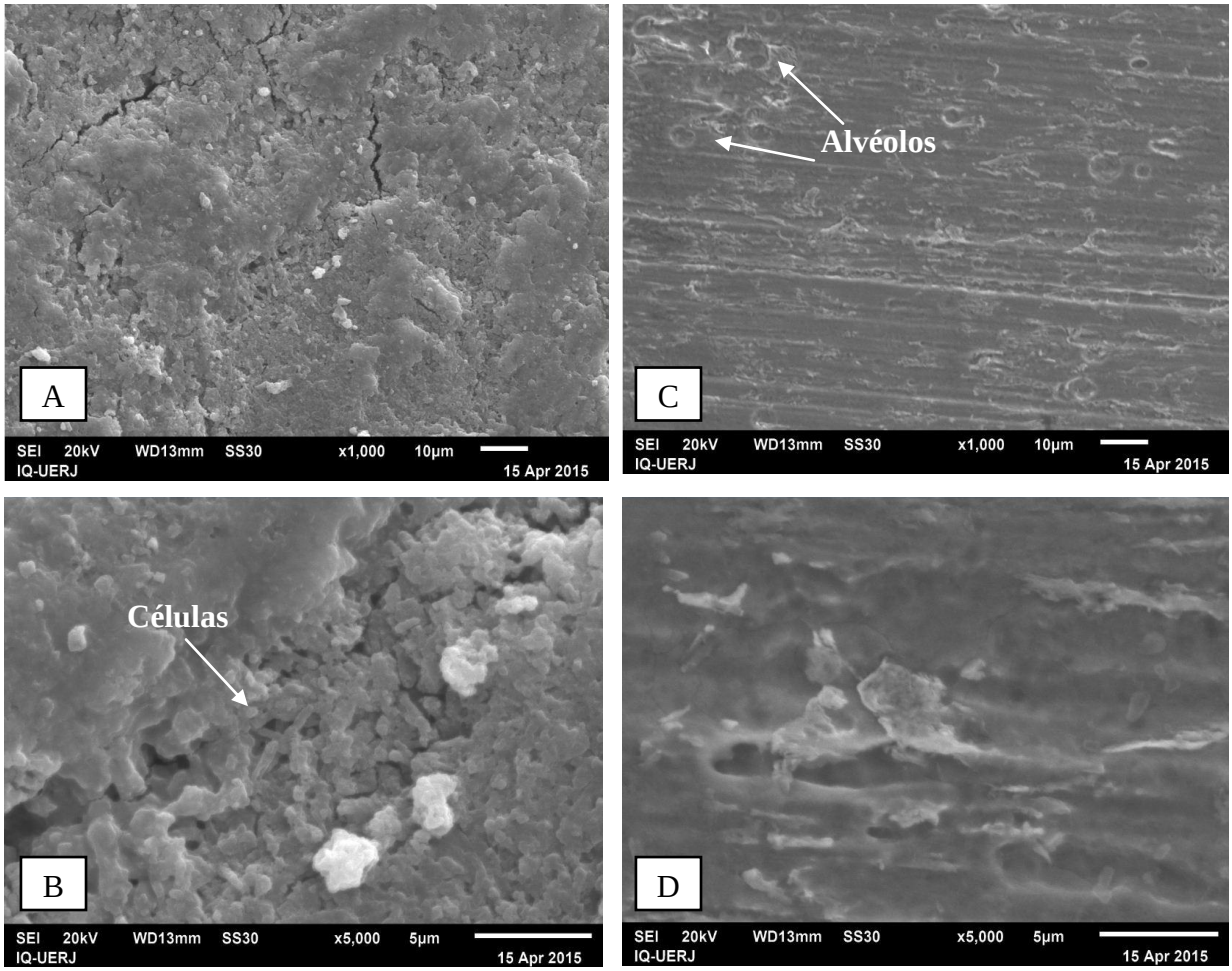
contato de 24 horas. A fim de verificar um possível ataque ao substrato, são também mostradas micrografias realizadas após a remoção do biofilme.

Figura 35 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o óleo de alho foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

Figura 36 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o glutaraldeído foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

Observando a Figura 35A, para a superfície do aço carbono previamente coberta com biofilme e exposta por 24 horas ao meio contendo água do mar e óleo de alho, foi possível notar que a superfície do aço estava quase toda coberta por uma película razoavelmente homogênea, provavelmente devido aos compostos de alho adsorvidos sobre o biofilme. Contudo, alguns *clusters* (aglomerados) também podem ser observados, como identificado na figura. Na maior ampliação (Figura 35 B) nota-se a presença de BRS por baixo de uma película. Este resultado demonstra que apesar da pequena redução da população de BRS sésseis, o óleo de alho aplicado nessas condições pode ter interagido com a superfície do aço através da adsorção de seus compostos sobre o biofilme já formado.

Após a remoção do biofilme (Figuras 35C e 35D) foi possível observar a presença de corrosão uniforme e também corrosão localizada alveolar (formação de sulcos arredondados de pequena profundidade), associadas ao crescimento microbiano na superfície, já que o óleo de alho aplicado ao sistema por um tempo de contato de 24 horas, aparentemente evitou a aceleração do processo corrosivo.

As Figuras 36A e 36B, referentes aos ensaios em que o biofilme já formado é exposto por 24 horas ao meio de água do mar artificial contendo glutaraldeído, exibem a presença de um filme não homogêneo e trincado, contendo poucos aglomerados celulares sobre a superfície do aço, embora células de BRS ainda possam ser vistas na maior ampliação (Figura 36B). Este resultado sugere que o glutaraldeído foi capaz de quebrar, mas não de remover o biofilme formado. O glutaraldeído, também usado como fixador celular para microscopia tem efeito endurecedor sobre o biofilme já formado, causando perda de flexibilidade e trincamento deste. Assim, pode ter causado redução no número de bactérias sésseis, mas não removeu o biofilme.

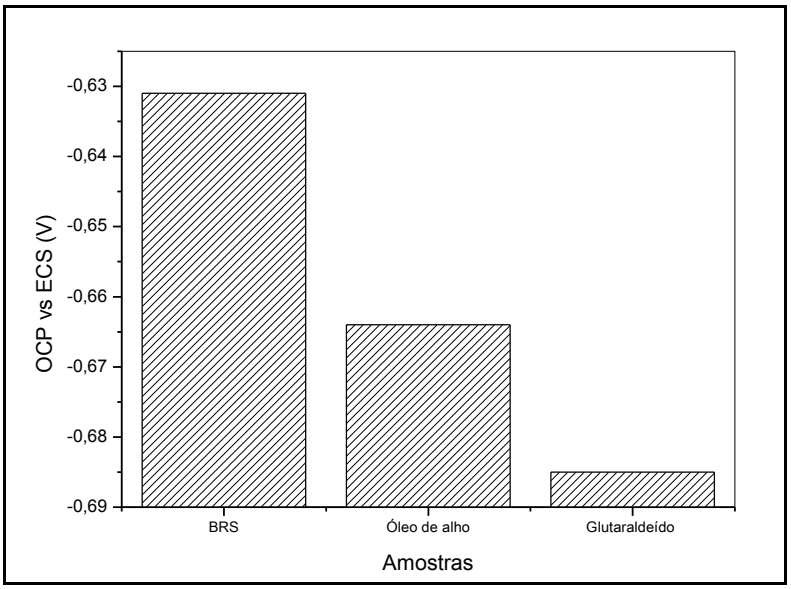
Após a remoção do biofilme com solução de Clark (Figuras 36C e 36D) foi observada a presença de corrosão uniforme e localizada alveolar, neste caso também relacionadas com o crescimento prévio das BRS na superfície do metal. O glutaraldeído aplicado para esta condição de ensaio (tempo de contato de 24 horas) pareceu não intensificar a corrosão da superfície do aço.

3.3.1.3 Ensaios eletroquímicos

3.3.1.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 37 exibe a variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, em meio de água do mar sintética, para a condição de ensaio em que os biocidas foram aplicados após a formação de biofilmes, com tempo de contato de 24 horas.

Figura 37 - Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas



Fonte: O autor, 2015.

Para estes ensaios, o potencial de circuito aberto também foi deslocado para valores mais negativos, similar ao que foi observado na Figura 31, em que os biocidas foram aplicados antes da formação do biofilme. Para o ensaio com o óleo de alho, o potencial de circuito aberto do eletrodo de aço atingiu o valor de -0,664V e para o ensaio contendo glutaraldeído, o potencial do eletrodo medido foi -0,685V. Em ambos os casos, as mudanças

nos valores de potencial de circuito aberto sugerem possíveis alterações na superfície aço/biofilme na presença dos biocidas.

3.3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

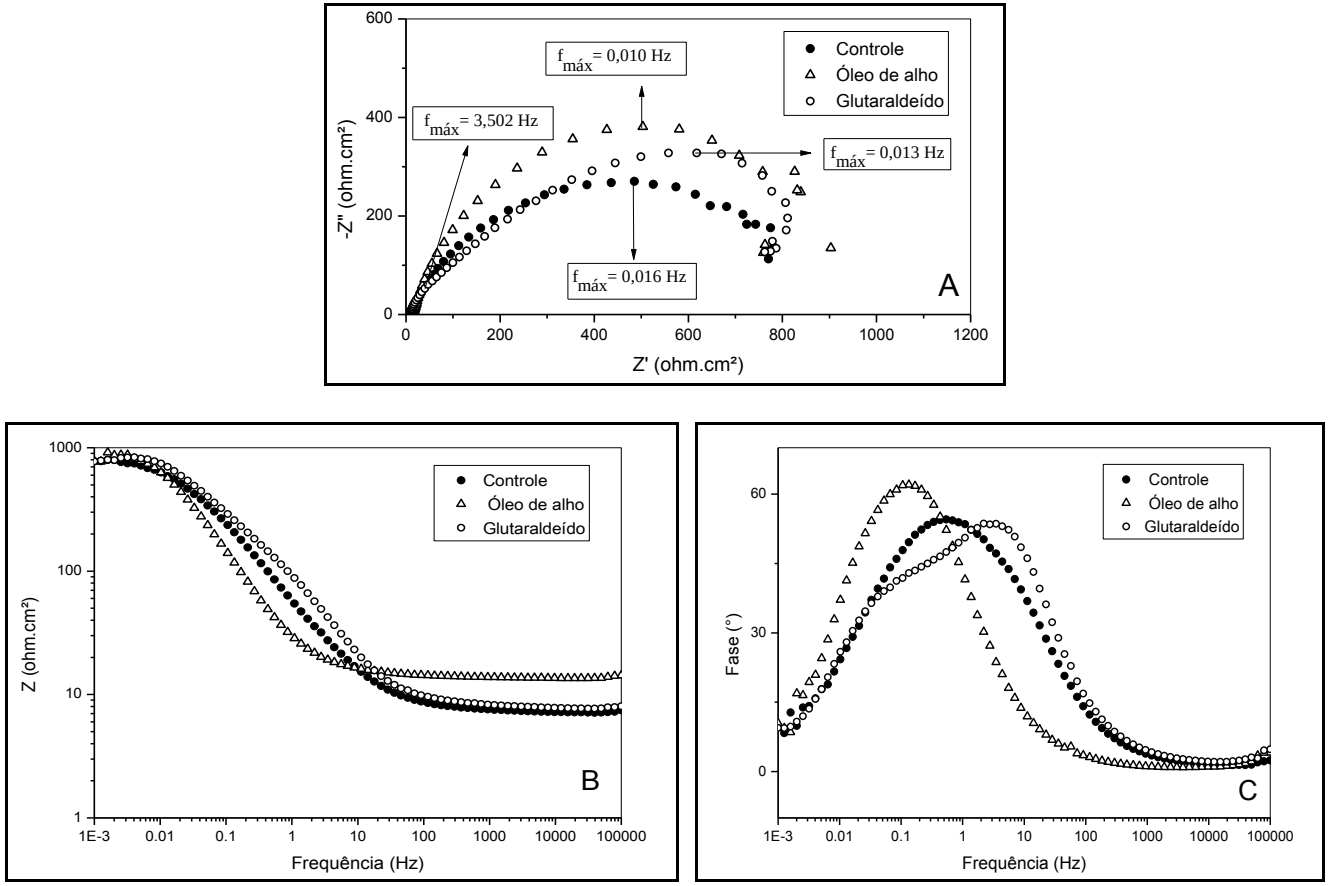
Os diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020, em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação de biofilme, usando um tempo de contato de 24 horas, são apresentados na Figura 38.

Observa-se, nos diagramas de Nyquist (Figura 38A), que a adição por 24h dos produtos testados aos corpos de prova com os biofilmes já formados apresentaram pequenas variações no tamanho dos arcos capacitivos, em relação ao ensaio na ausência destes. Por outro lado, há uma maior variação dos arcos em relação ao eixo imaginário (-Z”), que está relacionado com a capacitância da dupla camada (C_{DCE}), principalmente para o ensaio realizado em presença de óleo de alho. Embora menos evidentes no diagrama de Bode (Figura 38B), algumas variações mais interessantes podem também ser observadas no diagrama de fase (Figura 38C), nos ensaios com a adição dos biocidas.

Para o ensaio com adição do óleo de alho, o valor máximo do ângulo de fase foi deslocado para menores valores de frequências. Isso pode significar que o óleo de alho pode ter se aderido ao biofilme já formado, originando um produto com característica mais condutora do que o próprio biofilme. De fato, a Figura 35A mostra que o óleo de alho aparentemente se aderiu ao biofilme já formado, contribuindo para o aumento do arco capacitivo no eixo imaginário observado na Figura 38A.

No caso do glutaraldeído verifica-se, também no diagrama de fase, a presença de mais de uma constante de tempo, com um primeiro máximo em médias frequências e um segundo máximo em baixas frequências. Nesse caso, o efeito biocida reduziu o número de bactérias sésseis, sem remover o biofilme, conforme observado na Figura 36. Em ambos os casos, estas variações, juntamente com as micrografias e os valores de OCP, comprovam que mudanças na superfície aço/biofilme podem ter ocorrido com a adição dos biocidas ao meio após a formação do biofilme.

Figura 38 - Diagramas de Nyquist (A), Bode (B) e Fase (C) para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas



Fonte: O autor, 2015.

A Tabela 12 mostra os valores para os dados de EIE simulados para os ensaios com biocidas adicionados à água do mar sintética depois de formado o biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. Os dados de EIE para o óleo de alho foram simulados com o circuito simples, apresentado na Figura 25A. Como, para o glutaraldeído, notou-se a presença de mais de uma constante de tempo, o circuito utilizado para simular os dados de EIE neste caso foi o mesmo apresentado na Figura 26A.

Tabela 12 - Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono 1020 para os ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme por um tempo de contato de 24 horas, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente das Figuras 25A (óleo de alho) e 26A (glutaraldeído)

	R_e (Ω)	R_{tc} (Ω cm²)	C_{DCE} (μF cm $^{-2}$)	N
Controle	3,49	744	$1,67x10^{-2}$	0,711
Óleo de alho	7,21	811	$2,90x10^{-2}$	0,840
Glutaraldeído	4,08	819	$1,33x10^{-2}$	0,663
		R_f = 204	C_{DCEf} = $3,17x10^{-3}$	N_f = 0,793

Fonte: O autor, 2015.

Analisando a Tabela 12, verifica-se que houve um pequeno aumento no valor de R_{tc} para o sistema aço/biofilme imerso no meio corrosivo contendo óleo de alho. Provavelmente, a adesão dos compostos do alho na superfície do biofilme dificultou o processo de transferência de carga, principalmente em função da ação do biocida proposto como inibidor de corrosão, pois o decréscimo da proliferação das bactérias sésseis durante 24h de ensaio foi muito pequeno. Por outro lado, nota-se que houve um pequeno aumento em C_{DCE}, o que pode ser relacionado com os resultados observados no diagrama de fase e com o tipo do filme final formado. Sendo esse filme condutor e poroso, provavelmente não impedirá a continuidade do processo corrosivo do metal no meio de água do mar artificial, conforme pode ser visto nas microscopias apresentadas nas Figuras 35 C e 35D. Assim, com base nesses resultados e nos pequenos valores de redução das bactérias sésseis encontrados na quantificação microbiana, é

possível sugerir que a adição do óleo de alho ao meio corrosivo estudado após o biofilme ter se estabelecido na superfície, pode não ser uma alternativa interessante, apesar de ambientalmente não agressiva, para o controle da corrosão por BRS já existente.

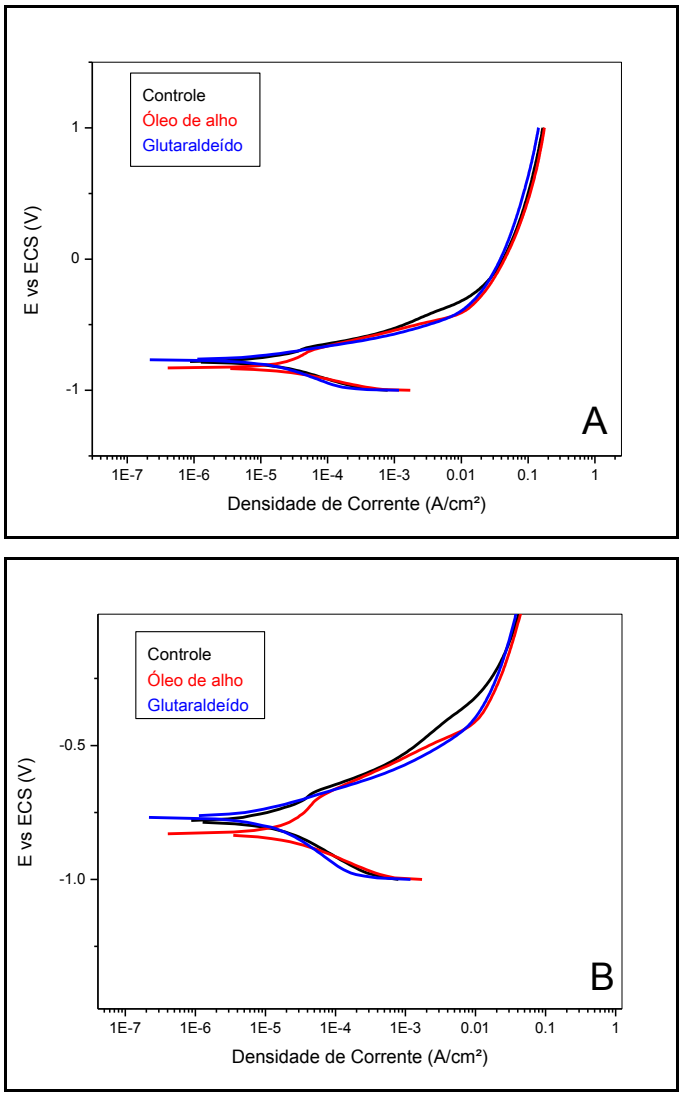
Por outro lado, para o sistema aço/biofilme imerso no meio contendo glutaraldeído por 24h, observa-se que o valor de R_{tc} aumentou em comparação com o ensaio sem a adição deste biocida. Esse resultado, juntamente com um pequeno decréscimo no valor de C_{DCE} e à presença de duas constantes de tempo (a segunda, em altas frequências, aqui denominada por R_f C_{DCEf}) pode indicar que o glutaraldeído contribuiu realmente para a redução no número de bactérias sésseis, favorecendo, a diminuição da corrosão do substrato. Esse resultado concorda com os resultados de quantificação (Figura 34) e de microscopia eletrônica de varredura (Figura 36).

3.3.1.3.3 Polarização Potenciodinâmica

As curvas de polarização potenciodinâmica do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas, são apresentadas na Figura 39A em toda a faixa de potencial estudado (-1 a +1V). A ampliação dessas curvas na região em que é válida a análise de Tafel está ilustrada na Figura 39B. Os principais parâmetros eletroquímicos, tais como potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), os coeficientes de Tafel, anódico (β_a) e catódico (β_c), e também a taxa de corrosão (taxa $_{corr}$), são mostrados na Tabela 13.

Nas Figuras 39A e 39B pode-se notar que as curvas de polarização do substrato de aço no ensaio em que o biocida óleo de alho foi adicionado ao meio, depois da formação de biofilme, comportaram-se de modo diferente, quando comparadas com o ensaio controle. Houve um deslocamento dos potenciais de corrosão do substrato para valores mais negativos e a curva está deslocada para maiores valores de corrente. Esse fato sugere que um processo mais acentuado de corrosão pode ter ocorrido nessas condições, conforme também verificado nos ensaios de EIE.

Figura 39 – A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas. B: Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel



Fonte: O autor, 2015.

Por outro lado, não foi verificado na curva relativa ao ensaio com glutaraldeído, a presença do pequeno patamar de corrente anódica observado na curva do aço nas condições do ensaio controle e do ensaio contendo óleo de alho. Esse patamar é provavelmente decorrente da formação de produtos de corrosão na superfície do eletrodo. No caso da curva do aço no meio contendo glutaraldeído, no entanto, ocorreu a dissolução ativa do metal.

Tabela 13 - Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 24 horas

	E_{corr} (V)	I_{corr}(A/cm^2)	β_a(V/dec)	β_c (V/dec)	Taxa $_{corr}$ (mm/ano)
Controle	-0,78	2,24x10^{-6}	0,074	0,077	5,37x10^{-2}
Óleo de alho	-0,83	4,35x10^{-6}	0,108	0,069	1,01x10^{-1}
Glutaraldeído	-0,76	1,68x10^{-6}	0,060	0,074	3,91x10^{-2}

Fonte: O autor, 2015.

Analisando as constantes de Tafel na Tabela 13, pode-se observar que o valor de β_a para ensaio com óleo de alho aumentou significativamente, chegando a valores próximos dos ensaios com BRS em maiores tempos de incubação (Tabela 9). Isto comprova que a adesão deste composto ao biofilme já formado originou um filme que contribuiu para acelerar o processo corrosivo, conforme discutido anteriormente para os ensaios de EIE. A Tabela 13 também mostra que, conforme esperado, os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão aumentaram e o valor de E_{corr} foi deslocado para valores mais negativos, o que confirma a intensificação da corrosão.

Comportamento diferente foi observado para o sistema aço/biofilme em meio contendo glutaraldeído, por 24h. Nesse caso, a constante de Tafel β_a diminuiu um pouco, ficando mais próximos dos valores verificados para o aço nessas condições (Tabela 9). Por outro lado, β_c praticamente não se alterou, mostrando que, nessas condições, não houve influência do biocida na reação catódica. Os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão obtidos na presença deste biocida diminuíram em relação ao controle, e o valor de E_{corr} foi deslocado,

embora não significativamente, para valores mais positivos. Estes resultados mostram que o glutaraldeído pode ter evitado a evolução do processo corrosivo através da redução da população de BRS sésseis, corroborando os resultados de EIE e as análises microscópicas. Estes resultados confirmam também que o biocida glutaraldeído, adicionado após a formação de biofilme, demonstrou evitar aceleração do processo corrosivo do aço quando aplicado, por 24h ao meio corrosivo.

Esses resultados indicam que apenas o glutaraldeído poderia ser útil para o decréscimo das células sésseis e redução da CMI, ao ser aplicado por um tempo de 24h após a formação do biofilme. Embora o óleo de alho também consiga reduzir as células sésseis, isso ocorre em proporção muito menor que o glutaraldeído. Além disso, esse biocida favorece a formação de um filme mais condutor na superfície do aço, contribuindo para acelerar a corrosão.

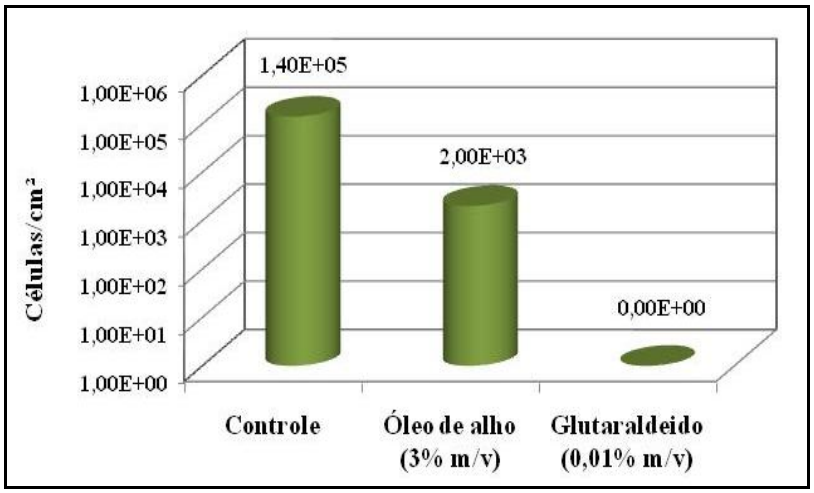
3.3.2 Tempo de contato de 7 dias

3.3.2.1 Avaliação do crescimento microbiano

A quantificação microbiana para as células de BRS sésseis, obtida através da técnica do NMP, para os ensaios com biocidas aplicados após a formação de biofilme por um tempo de contato de 7 dias, em comparação com o ensaio controle, está apresentada na Figura 40.

Pode-se observar na Figura 40 que valores menores de células sésseis de BRS, quando comparados com o controle, foram encontrados após a aplicação dos biocidas por um tempo de contato de 7 dias. Uma redução de 36 % foi obtida no meio contendo óleo de alho, enquanto que para o glutaraldeído não foi observado crescimento de BRS sésseis. Esse resultado sugere que um aumento do tempo de contato poderia ser eficaz para a redução da população bacteriana na superfície do aço.

Figura 40 - Quantificação microbiana para ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 7dias.



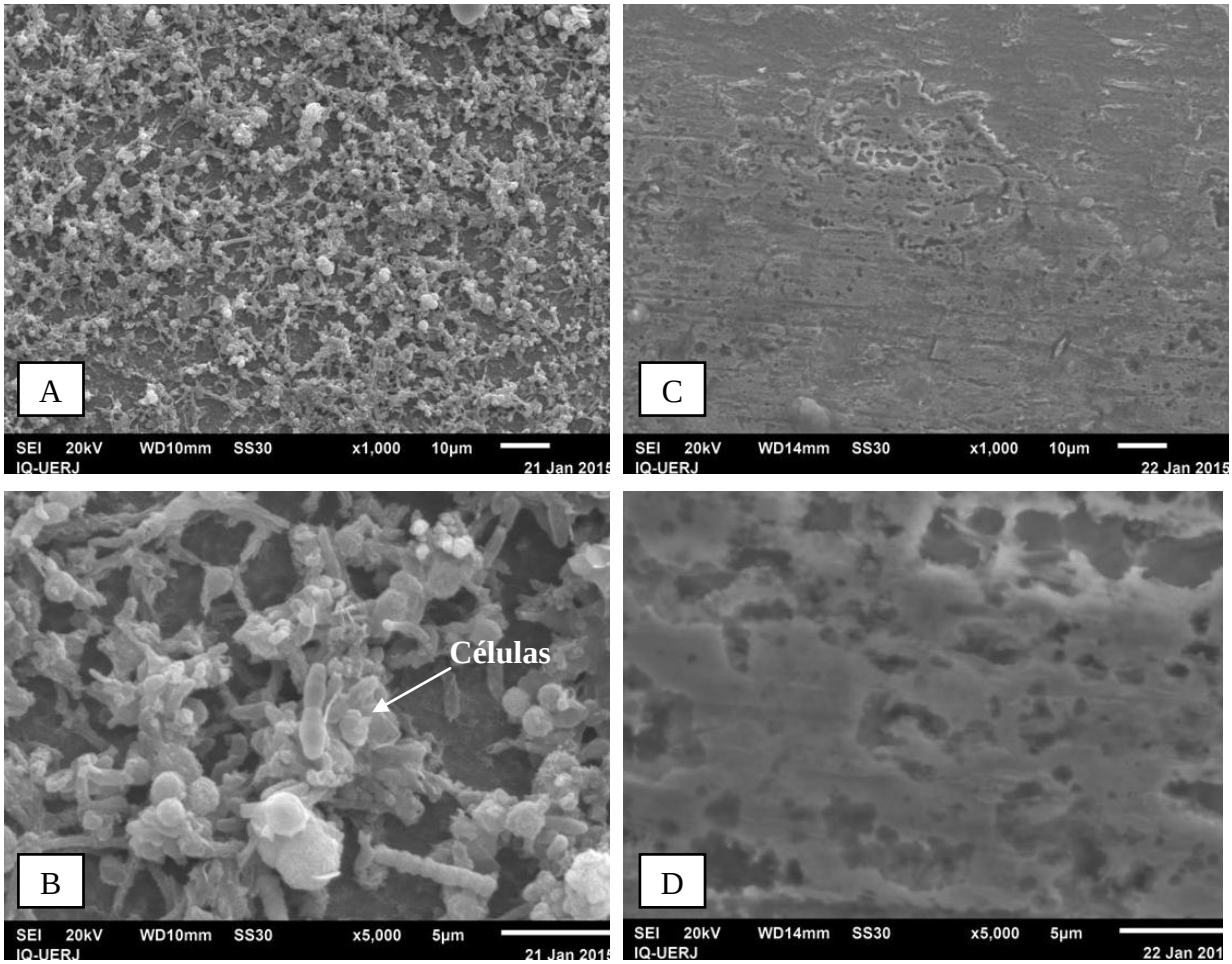
Fonte: O autor, 2015.

Contudo, é importante ressaltar que, nesse caso, os resultados obtidos para a quantificação da população de BRS podem estar associados não só com o efeito dos biocidas sobre o biofilme, mas também com a estarvação dos nutrientes, já que o meio utilizado nestes ensaios (água do mar sintética) era pobre em nutrientes e o tempo de ensaio foi elevado (QUEIROZ, 2015). Para uma conclusão mais detalhada, esses resultados serão comparados com aqueles encontrados nos ensaios eletroquímicos e de MEV.

3.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

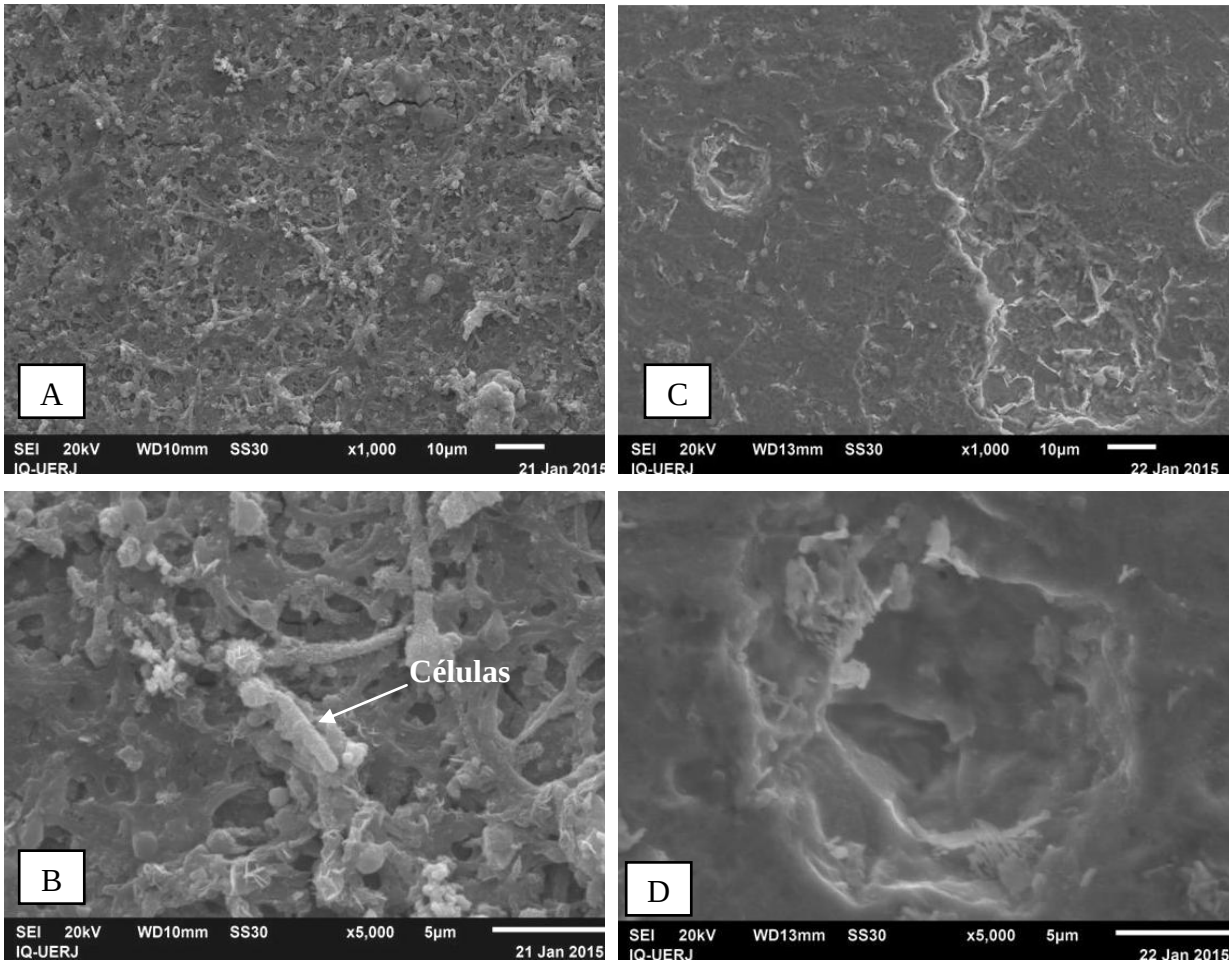
As imagens apresentadas nas Figuras 41 e 42 mostram as micrografias obtidas para os ensaios em que os biocidas foram aplicados depois de formado o biofilme, em um tempo de contato de 7 dias. A fim de verificar um possível ataque ao substrato, são também mostradas micrografias realizadas após a remoção do biofilme.

Figura 41 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o óleo de alho foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

Figura 42 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 em que o glutaraldeído foi aplicado ao meio depois da formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. Biofilme com aumentos de 1000X (A) e 5000X (B). Superfície após remoção do biofilme com aumentos de 1000X(C) e 5000X (D)



Fonte: O autor, 2015.

A superfície do aço carbono previamente coberta com biofilme, exposta por 7 dias ao meio contendo água do mar e óleo de alho (Figura 41A) exibe uma intensa aglomeração celular que parece estar distribuída em praticamente toda a superfície do corpo de prova. Na maior ampliação (Figura 41B) observa-se a presença das BRS, bem como flocos que provavelmente se devem à formação de SPE. Essas imagens são muito semelhantes àquelas obtidas para o micro-organismo crescido por 7 dias, sem a presença de biocidas (Figuras 20A e 20B), embora a superfície pareça estar mais homogeneamente recoberta no presente experimento. Este resultado demonstra que apesar do decréscimo de células viáveis quantificadas na superfície do aço, aparentemente, o óleo de alho não modificou a superfície aço/biofilme, não sendo observada formação de película protetora.

Após a remoção do biofilme (Figuras 41C e 41D), foi possível observar corrosão localizada por pites na superfície do aço, provavelmente originada pelo crescimento do micro-organismo, embora corrosão uniforme também seja verificada. Assim, a exposição do sistema ao meio contendo óleo de alho por 7 dias aparentemente não evitou que o processo corrosivo continuasse ocorrendo.

Observando agora as Figuras 42A e 42B, referentes aos ensaios em que o biofilme já formado é exposto por 7 dias ao meio contendo glutaraldeído, pode-se notar a presença de biofilme, porém com menos células de BRS visíveis e distribuídas de forma mais dispersa sobre a superfície do aço. Esse resultado sugere que o glutaraldeído, durante o período de exposição, pode ter contribuído para o endurecimento e modificação da estrutura final do biofilme/produto de corrosão, e não só para a eliminação das bactérias. Esse processo, porém, pode influir diretamente no processo corrosivo do metal.

Após a remoção do biofilme com solução de Clark, nova micrografia foi obtida (Figuras 42C e 43D), sendo observada a presença de pites, caracterizando o processo de corrosão localizada. Esse processo foi intensificado pela formação prévia do biofilme de BRS, bem como pela exposição prolongada do corpo de prova com o meio de água do mar sintética contendo o glutaraldeído. Corrosão uniforme também pode ser notada.

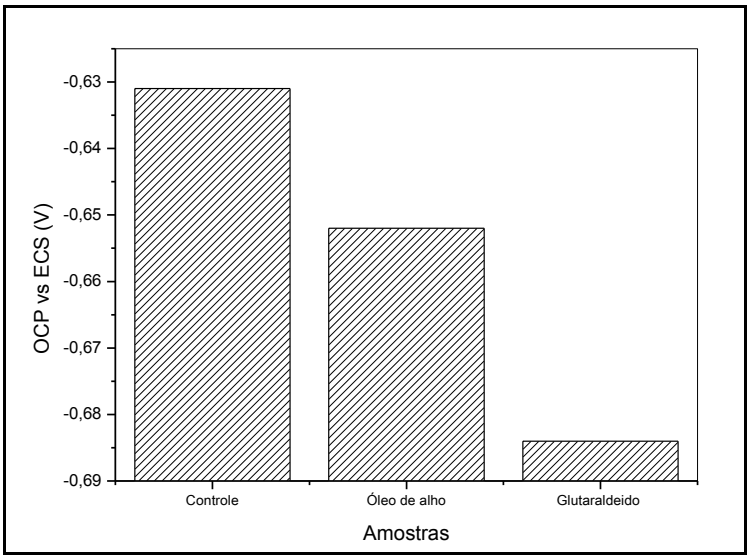
3.3.2.3 Ensaios eletroquímicos

3.3.2.3.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 43 exibe a variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, em meio de água do mar sintética para a condição de ensaio em que os biocidas foram aplicados após a formação de biofilmes, com tempo de contato de 7 dias.

Para os ensaios realizados com aplicação de biocidas por 7 dias após o biofilme formado, ocorreu um deslocamento do potencial de circuito aberto para valores mais negativos. Para o ensaio com óleo de alho, o potencial atingiu o valor de -0,652V enquanto que para o ensaio contendo glutaraldeído, um valor de -0,684V foi obtido. Estes valores ficaram próximos àqueles obtidos para 24h de exposição do sistema aço/biofilme aos respectivos biocidas (Figura 37), sugerindo que as modificações anteriormente ocorridas na superfície aço/biofilme com a exposição aos biocidas por 24h continuam ocorrendo.

Figura 43 - Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias



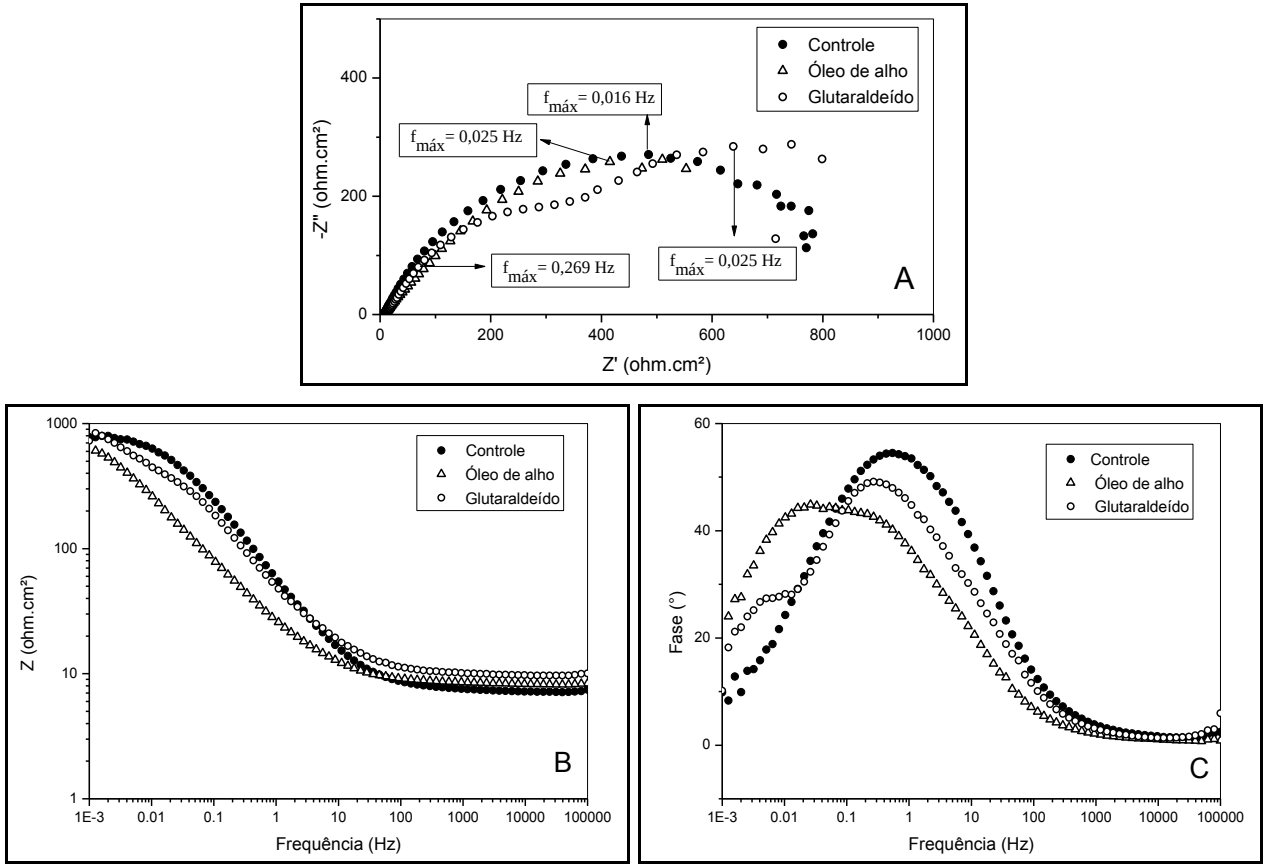
Fonte: O autor, 2015.

3.3.2.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Os diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, são apresentados na Figura 44.

Observando o digrama de Nyquist (Figura 44A), é possível notar que o tamanho do arco capacitivo obtido para o ensaio em meio contendo óleo de alho diminuiu, quando comparado com o arco capacitivo encontrado na ausência do mesmo. Este resultado é comprovado pelo menor valor do módulo de Z, no diagrama de Bode (Figura 44B) e pelo deslocamento do máximo de ângulo de fase para menores frequências (Figura 44C) para os experimentos realizados nessa condição. Neste caso, o processo corrosivo pode ter sido acelerado porque, além do período de imersão por 7 dias do corpo de prova no meio de cultura contendo BRS (para que o biofilme fosse formado), o sistema ficou em contato com a água do mar adicionada do óleo de alho por mais 7 dias. Como o biofilme já tinha sido estabelecido, o óleo de alho adsorvido na superfície do biofilme não foi capaz de proteger a superfície do aço, conforme comentado anteriormente. Assim como foi verificado para os ensaios que duraram 24h, a adsorção do óleo de alho sobre o biofilme após 7 dias de exposição gerou uma película mais condutora que o biofilme. Desse modo, conforme também sugerido pelos ensaios morfológicos, o processo corrosivo continuou progredindo mesmo na presença do óleo de alho, refletindo na redução do tamanho do arco e no deslocamento do valor máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência.

Figura 44 - Diagramas de Nyquist (A), Bode (B) e fase (C) para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias

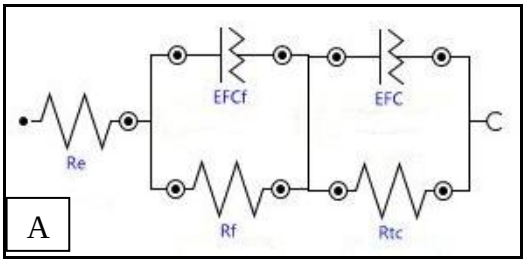


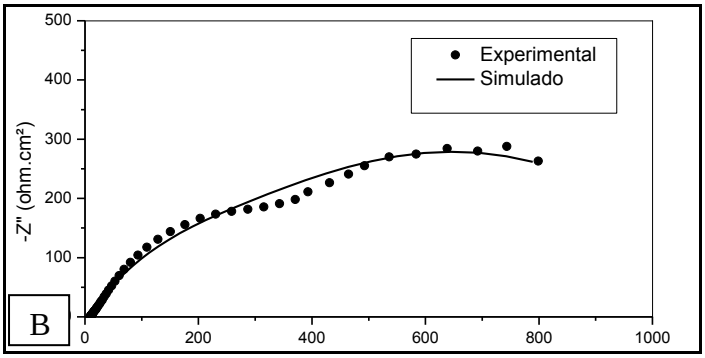
Fonte: O autor, 2015.

Para os ensaios realizados na presença de glutaraldeído, observam-se dois arcos capacitivos no diagrama de Nyquist da Figura 43A, indicando que duas constantes de tempo regem o processo corrosivo nesse caso. Esse comportamento é melhor evidenciado pelo diagrama de fase (Figura 44C), onde se pode observar um primeiro máximo em médias frequências, e um segundo máximo, em baixas frequências. Comparando, porém, com os ensaios realizados nestas mesmas condições, mas com 24h de exposição, os valores máximos dos ângulos de fase estão deslocados para menores frequências, sugerindo que os produtos de corrosão na superfície após 7 dias de exposição são mais condutores que os verificados para 24h. As alterações encontradas sugerem que este biocida também interferiu na superfície do sistema aço/biofilme após 7 dias de exposição, podendo ter contribuído para a modificação da estrutura deste, conforme verificado nas imagens das Figuras 42A e 42B, gerando um produto de corrosão final mais condutor.

Os resultados de EIE para os ensaios em que os corpos de prova com biofilme foram expostos aos biocidas estudados por um tempo de contato de 7 dias, foram simulados, no caso do óleo de alho, com o circuito simples apresentado na Figura 25A. Para o glutaraldeído, porém, não foi possível realizar um bom ajuste com nenhum dos dois circuitos apresentados até o momento. Como para este biocida notou-se a presença de mais de uma constante de tempo, o que foi evidenciado até mesmo no diagrama de Nyquist (Figura 44A), sugere-se que nesse caso há a presença de uma camada mista de SPE e produtos de corrosão semicondutores, que são estáveis o suficiente para serem revelados separadamente do substrato, originando duas constantes de tempo (ALABBAS et al, 2013). Assim, provavelmente, o primeiro arco se relaciona com este biofilme modificado, enquanto que no segundo arco, têm-se os processos que ocorrem com a dupla camada elétrica, propriamente dita. Devido a isso, o circuito utilizado para simular os dados de EIE para a condição em que glutaraldeído foi aplicado ao meio após formado o biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, foi o modelo de circuito apresentado na Figura 45A. Esta condição simulada com o circuito proposto esta ilustrada na Figura 45B.

Figura 45 – A: Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE para o ensaio em que glutaraldeído foi aplicado ao meio após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias (R_e – resistência do eletrólito; R_f – resistência do filme; R_{tc} - resistência à transferência de carga; EFC - elemento de fase constante; EFC_f - elemento de fase constante do filme;). B: Simulação para o ensaio glutaraldeído após formado o biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, usando o circuito proposto





Fonte: O autor, 2015.

A Tabela 14 mostra os valores para os dados de EIE simulados para a condição de ensaios em que os corpos de prova com biofilme foram expostos aos biocidas estudados por um tempo de contato de 7 dias, usando os circuitos equivalentes das Figuras 25A e 45A.

Tabela 14 - Valores de R_{tc} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE do aço carbono 1020 para os ensaios em que os biocidas foram aplicados após a formação do biofilme por um tempo de contato de 7 dias, em meio de água do mar sintética, usando o circuito equivalente das Figuras 25A (óleo de alho) e 45A (glutaraldeído)

	R_e (Ω)	R_{tc} (Ω cm²)	C_{DCE} (μF cm $^{-2}$)	N
Controle	3,49	744	$1,67x10^{-2}$	0,711
Óleo de alho	4,38	725	$1,23x10^{-1}$	0,650
Glutaraldeído	4,69	798	$2,13x10^{-1}$	0,653
		R_f = 315	C_{DCEf} =$2,65x10^{-2}$	N_f = 0,700

Fonte: O autor, 2015.

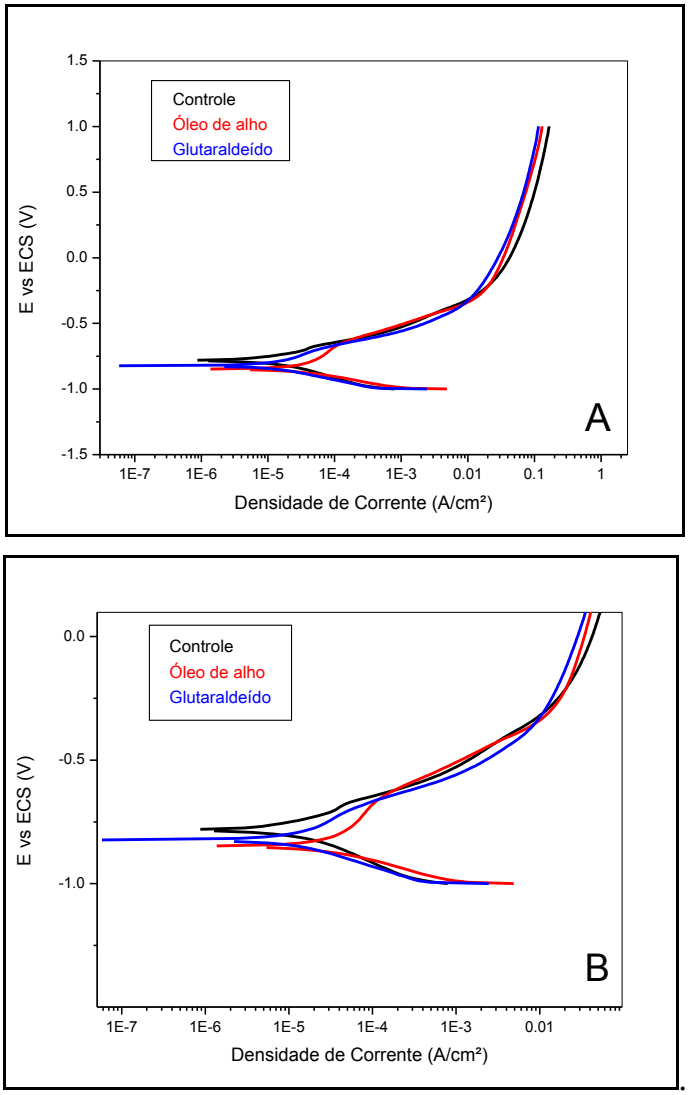
Os valores de R_{tc} e C_{DCE} apresentados na Tabela 14 confirmam o que foi visto nos diagramas de EIE (Figura 44) para os ensaios com biocidas. O valor de R_{tc} para o aço exposto ao meio com óleo de alho por 7 dias diminuiu, enquanto que o valor de C_{DCE} aumentou, confirmando a aceleração do processo corrosivo nestas condições, conforme discutido anteriormente. Já para o ensaio do sistema aço/biofilme na presença de glutaraldeído, embora o valor de R_{tc} tenha aumentado, o valor de C_{DCE} também aumentou, confirmando a presença de um filme mais condutor na superfície do substrato. Provavelmente, o glutaraldeído ao eliminar as bactérias sésseis mudou a estrutura final do biofilme, permitindo que os produtos de corrosão semicondutores aumentassem o ataque galvânico ao metal no meio em estudo.

3.3.2.3.3 Polarização Potenciodinâmica

As curvas de polarização do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, são apresentadas na Figura 46A em toda a faixa de potencial estudado (-1 a +1V). A ampliação dessas curvas na região em que é válida a análise de Tafel

está ilustrada na Figura 46B. Os principais parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel, tais como potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), os coeficientes de Tafel, anódico (β_a) e catódico (β_c) e também a taxa de corrosão, são mostrados na Tabela 15.

Figura 46 – A: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias. B: Ampliação das curvas de polarização na região de Tafel



Fonte: O autor, 2015.

Tabela 15 - Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para ensaios em que os biocidas foram aplicados ao meio depois da formação do biofilme, por um tempo de contato de 7 dias

	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm^2)	β_a (V/dec)	β_c (V/dec)	$Taxa_{corr}$ (mm/ano)
Controle	-0,78	$2,24 \times 10^{-6}$	0,074	0,077	$5,37 \times 10^{-2}$
Óleo de alho	-0,85	$7,67 \times 10^{-6}$	0,119	0,064	$1,70 \times 10^{-1}$
Glutaraldeído	-0,82	$3,05 \times 10^{-6}$	0,100	0,077	$7,11 \times 10^{-2}$

Fonte: O autor, 2015.

As Figuras 46A e 46B mostram que as curvas de polarização do aço para os ensaios em que os biocidas foram adicionados após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, apresentaram-se deslocadas para valores mais negativos de E_{corr} e deslocadas para maiores valores de densidade de corrente, quando comparadas ao ensaio controle. Essas variações podem ser numericamente comprovadas na Tabela 15. Todas as curvas apresentam um pequeno patamar de corrente anódica, sugerindo a formação de um produto de corrosão pouco estável, que cobre a superfície do aço. Analisando os valores das constantes de Tafel apresentadas na Tabela 15, observa-se que o valor de β_a aumentou, tanto para o ensaio com óleo de alho, quanto para o ensaio na presença de glutaraldeído, indicando que o processo corrosivo pode ter sido acelerado em ambos os casos.

Um aumento nos valores de I_{corr} e da taxa de corrosão também foram evidenciados na tabela. O maior valor de I_{corr}, bem como da taxa de corrosão foram, mais uma vez, obtidos para o ensaio na presença de óleo de alho, demonstrando novamente que o processo corrosivo foi acelerado para a condição de ensaio em que este produto foi aplicado depois de formado o biofilme. Os valores de I_{corr} do aço e da taxa de corrosão para o meio contendo glutaraldeído também aumentaram, porém em menor intensidade, sugerindo que a corrosão também foi acelerada, porém em menor proporção do que o ocorrido no meio contendo óleo de alho. Comparando com os ensaios realizados com um tempo de contato de 24h aos meios contendo biocida, notou-se uma aceleração da corrosão em ambos os casos. Logo, o tempo de

exposição de 7 dias aos biocidas foi provavelmente excessivo e não demonstrou ser eficiente no controle da corrosão.

CONCLUSÕES

A avaliação da CMI por BRS permitiu concluir que:

- A quantificação microbiana para as células de BRS sésseis mostrou que em 7 dias de imersão a população bacteriana atingiu o valor máximo de $1{,}4x10^5$ células/cm², confirmando a capacidade deste grupo de bactérias em colonizar e aderir em superfícies metálicas.

- A análise de MEV do biofilme e do corpo de prova para o meio contendo BRS mostrou a formação de um biofilme aderido na superfície do aço carbono. Esse biofilme causou corrosão localizada por pites e também corrosão intergranular na superfície do aço, em função da presença de íons sulfeto, confirmando que as BRS levaram a uma aceleração da corrosão do metal no meio estudado.

- Os resultados microscópicos foram confirmados pelos ensaios eletroquímicos, os quais mostraram uma intensa aceleração do processo corrosivo na presença de BRS. O potencial de circuito aberto do aço foi deslocado para valores mais positivos, evidenciando um fenômeno conhecido como "enobrecimento". Nos ensaios de EIE foram observados que os valores de R_{tc} e C_{DCE} diminuíram e aumentaram, respectivamente. E os ensaios de polarização exibiram um aumento no valor de I_{corr} e um deslocamento do valor de E_{corr} para valores mais negativos.

Os ensaios com biocidas aplicados antes da formação de biofilmes permitiram concluir que:

- O glutaraldeído inibiu completamente a população de BRS sésseis, enquanto o óleo de alho apresentou uma redução das células sésseis em 30%, quando comparados com o

mesmo tempo de crescimento do micro-organismo (7 dias) sem os biocidas. Esses resultados indicaram que, nas concentrações utilizadas nesse estudo (3% m/v para o óleo de alho e 0,01% m/v para o glutaraldeído), ambos podem ser utilizados como biocidas no controle da biocorrosão por BRS.

- A análise de MEV evidenciou que com a adição de óleo de alho ainda foi possível verificar a presença de células microbianas, além de uma película recobrindo o substrato, provavelmente formada por compostos do alho. Após a remoção do biofilme foi observada corrosão uniforme no lugar de pites, demonstrando que este biocida apesar de não ter inibido completamente o crescimento das BRS, atuou diminuindo a corrosão do aço no meio estudado. Para o glutaraldeído foi observada a presença de poucas células e após a remoção do biofilme a superfície apresentou corrosão intergranular. Isso demonstra que a concentração do biocida utilizada (0,01% m/v) foi suficiente para evitar o desenvolvimento de BRS, porém favoreceu a corrosão do aço.

- Os ensaios eletroquímicos de potencial de circuito aberto, EIE e polarização potenciodinâmica do aço mostraram que os biocidas reduziram o processo de corrosão do aço carbono. O óleo de alho exibiu uma maior inibição da corrosão quando comparado com o glutaraldeído, provavelmente devido à adsorção de seus componentes na superfície do aço, protegendo-o da corrosão.

Os ensaios com biocidas aplicados após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 24 horas, permitiram concluir que:

- Os biocidas óleo de alho e glutaraldeído apresentaram uma redução da população de BRS sésseis de 19% e 73%, respectivamente. O óleo de alho exibiu um baixo efeito bactericida, em função da pior adsorção de seus compostos na superfície contendo o

biofilme já formado. Já o glutaraldeído mostrou ser eficiente em eliminar células de BRS já estabelecidas em um biofilme.

- A análise de MEV mostrou que a superfície do aço carbono, previamente coberta com biofilme, exposta ao meio contendo água do mar e óleo de alho estava quase toda coberta por uma película. Isto sugere que mesmo com o baixo efeito na redução das células sésseis de BRS, o óleo de alho aplicado nessas condições pode ter interagido com a superfície aço/biofilme. Após a remoção do biofilme foi possível observar corrosão uniforme e localizada alveolar, associadas também ao crescimento microbiano na superfície. Para a superfície do aço exposta ao meio contendo glutaraldeído foi possível notar a presença de um biofilme não homogêneo e trincado, com poucos aglomerados celulares. Após a remoção do biofilme foi observada corrosão uniforme e localizada alveolar, neste caso também relacionadas com o crescimento prévio das BRS na superfície do metal, pois o glutaraldeído aplicado para esta condição de ensaio pareceu não agredir muito a superfície, não sendo observada uma corrosão intensa devido à adição deste biocida.

- Os ensaios eletroquímicos de EIE e polarização potenciodinâmica evidenciaram que o óleo de alho não evitou que o processo corrosivo continuasse ocorrendo, enquanto que o glutaraldeído, por ter apresentado uma alta redução das BRS sésseis, evitou que o processo corrosivo fosse acelerado.

Os ensaios com biocidas aplicados após a formação de biofilme, por um tempo de contato de 7 dias, permitiram concluir que:

- O óleo de alho apresentou uma redução da população de BRS sésseis de 36%, enquanto que para o glutaraldeído não foi observado crescimento de células de BRS sésseis, sugerindo que um aumento do tempo de contato pode ser eficaz para a redução da população bacteriana na superfície do cupom de aço. Porém, como nestes ensaios o

meio utilizado era pobre em nutrientes (água do mar sintética), estes resultados podem estar associados também com a falta de nutrientes.

- A análise de MEV mostrou que a superfície do aço carbono, previamente coberta com biofilme, exposta ao meio contendo água do mar e óleo de alho ainda apresentava este biofilme na superfície do corpo de prova, sugerindo que apesar do decréscimo de células viáveis quantificadas na superfície do aço, o óleo de alho não modificou a superfície aço/biofilme. Após a remoção do biofilme foi observada corrosão por pites, demonstrando que, nessa condição de ensaio, o óleo de alho não evitou que o processo corrosivo continuasse ocorrendo. Já para a superfície do aço exposta ao meio contendo glutaraldeído foi possível notar a presença de biofilme, porém com menos células de BRS visíveis, sugerindo que o biocida contribuiu para a modificação da superfície aço/biofilme e não só para a eliminação das bactérias. Porém, após a remoção do biofilme foi observada a presença de pites, caracterizando o processo de corrosão localizada.

- Os ensaios eletroquímicos de EIE e polarização potenciodinâmica para o sistema aço/biofilme evidenciaram um aumento no processo corrosivo do aço, devido à formação prévia de biofilme na superfície do aço, associado com o longo tempo de exposição dos corpos de prova em meio contendo água do mar e os biocidas.

De uma maneira geral, os ensaios realizados na presente dissertação mostraram que as BRS são capazes de acelerar significativamente a corrosão do aço carbono devido à formação de biofilme e produtos de corrosão na superfície do metal, e que esse tipo de corrosão pode ser controlado com a adição de biocidas. Quando os biocidas foram aplicados antes do biofilme ter sido formado, resultados melhores foram obtidos, demonstrando que tanto o óleo de alho, como o glutaraldeído diminuíram a corrosão do aço. O óleo de alho se apresentou como um promissor biocida natural, podendo substituir outros biocidas comerciais mais tóxicos. Além disso, sua ação como inibidor de corrosão também favoreceu o decréscimo dos processos corrosivos no meio estudado, ao contrário do glutaraldeído.

O uso dos biocidas após a formação prévia do biofilme não se mostrou tão eficiente, principalmente para longos tempos de exposição. O óleo de alho não evitou a aceleração da corrosão do aço, mesmo em 24h de exposição, sugerindo que sua aplicação não é vantajosa nestas condições. Já o glutaraldeído evitou a aceleração da corrosão apenas no tempo de contato de 24 horas.

Estes resultados ressaltam a importância da aplicação de métodos de prevenção e controle em casos de biocorrosão, preferencialmente antes que a corrosão tenha se instalado em um determinado sistema.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a ação dos biocidas nas células planctônicas;

- Estudar o efeito de outras concentrações e de tempos de contato menores que 7 dias dos biocidas nos meios para controle da CMI por BRS;

- Utilizar nos ensaios após a formação de biofilmes, um meio contendo uma pequena quantidade de nutrientes, já que como mencionado nesta dissertação o tempo longo de ensaio pode ter favorecido o decréscimo das células de BRS por falta de nutrientes;

- Testar a aplicação dos biocidas de forma periódica (tratamento contínuo), utilizando assim menores concentrações aplicadas continuamente por um determinado período;

- Avaliar o emprego em conjunto dos dois biocidas aqui estudados. Nesse caso como o óleo de alho mostrou ser um eficiente inibidor de corrosão, porém com baixo efeito bactericida para células de BRS, e o glutaraldeído apresentou alta eficácia em inibir o crescimento destas bactérias, não sendo, contudo, um inibidor de corrosão, supõe-se que estes biocidas possam ser empregados juntos. Assim seria possível eliminar as BRS de forma eficiente ao mesmo tempo em que o metal seria protegido da corrosão.

REFERÊNCIAS

AFIA, L. et al. Steel Corrosion Inhibition by Acid Garlic Essential Oil as a Green Corrosion Inhibitor and Sorption Behavior. **International Journal of Electrochemical Science**, Belgrado, Sérvia, v.9, p.8392 – 8406, 2014.

ALABBAS, F.M. et al. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v. 78, p. 34 – 42, 2013.

ALABBAS, F.M. et al. Microbial corrosion in linepipe steel under the influence of a sulfate-reducing consortium isolated from an oil field. **Journal of Materials Engineering and Performance**, Nova York, Estados Unidos, v. 22, n.11, p. 3517–3529, 2013.

ANDRADE, M. M. **Análise da cinética de formação de biofilmes em junta soldada longitudinal de aço API 5L X80 em sistema dinâmico**. 2013.138f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos Químicos e Metalúrgicos) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

ASHASSI-SORKHABI, H. et al. Corrosion behavior of carbon steel in the presence of two novel iron-oxidizing bacteria isolated from sewage treatment plants. **Biodegradation**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.23, p.69–79, 2012.

BADAWI, A.M. et al. Novel quaternary ammonium hydroxide cationic surfactants as corrosion inhibitors for carbon steel and as biocides for sulfate reducing bacteria (SRB). **Materials Chemistry and Physics**, Lausana, Suíça, v.124, p. 458-465, 2010.

BARCIA, O.E. et al. Application of the impedance model of de Levie for the characterization of porous electrodes. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v.47, p. 2109-2116, 2002.

BARTLETT, K. e KRAMER, J. Comparative performance of industrial water treatment biocides. Corrosion 2011 (Nace International), Houston, Estados Unidos, paper 11399, 2011.

BAYOUDH, S. et al. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber, **Colloids and Surfaces A: Physicochem Engineering. Aspects**, Amsterdã, Países Baixos, v. 318, p. 291–300, 2008.

BEECH, I.B. e GAYLARDE, C.C. Adhesion of Desulfovibrio desulfuricans and Pseudomonas fluorescens to mild steel surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, Inglaterra, v.67, p.201-207, 1989.

BEECH, I.B. et al. Extracellular polysaccharides from *Desulfovibriodesulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence of mild and stainless steel. **Applied Microbiology e Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.35, n.1, p.65-71, 1991.

BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C.; Recent advances in the study of biocorrosion. An overview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, Brasil, v. 30, p. 177-190, 1999.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state-of-the art methods of study. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v. 53, p. 177-183, 2004.

BEECH, I.B., SUNNER, J.A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, Madri, Espanha, v.8, p. 157-168, 2005.

BEECH, I.B. e CAMPBELL, S.A. Accelerated low water corrosion of carbon steel in the presence of a biofilm harbouring sulphate-reducing and sulphur-oxidising bacteria recovered from a marine sediment. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v. 54, p.14–21, 2008.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum). **Food Science and Technology**, San Diego, Estados Unidos, v.34, p.263-268, 2004.

BHOLA, S.M. et al. Neem extract as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: a preliminary investigation. **Engineering Failure Analysis**, Oxford, Inglaterra, v. 36, p. 92–103, 2014.

BORENSTEIN, S.B. Microbiologically Influenced Corrosion Handbook, **Industrial Press Inc**., Nova Iorque, Estados Unidos, 1994.

BRUNE, A.; FRENZEL, P.; CYPIONKA, H. Life at the oxic–anoxic interface: microbial activities and adaptations. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Reviews**, Amsterdã, Países Baixos, v. 24, p. 691–710, 2000.

CAÑIZARES, P. et al. Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against Helicobacter pylori. **Biotechnology Progress**, Washington, Estados Unidos, v.20, p.397–401, 2004.

CANO, E.; LAFUENTE, D.; BASTIDAS, D.M. Use of EIS for the evaluation of the protective properties of coatings for metallic cultural heritage: a review. **Jornal Solid State Electrochem**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.14, p.381–391, 2010.

CARVALHO, L.A. e ANDRADE, A.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.4, p.796-804, 2006.

CARVALHO, L.A. **Investigação das propriedades eletroquímicas do sistema Ti/$Ru_{0,3}$ $Ti_{(0,7-x)}$ Sn_xO_2 utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica.** 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CASTANEDA, H. e BENETTON, X.D. SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v. 50, p. 1169–1183, 2008.

CHAPMAN, J.S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v. 51, p.133 – 138, 2003.

CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. Biofilms. **John Wiley & Sons**, Nova Iorque, 796 p., 1990.

CLOETE, T.E.; JACOBS, L.; BROZEL, V.S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, Dordrecht, Países Baixos, v.9, p. 23–37, 1998.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v.51, p. 277 – 282, 2003.

COSTERTON, J.W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Califórnia, Estados Unidos, v. 49, p.711-745, 1995.

CRIZEL, M.M. Alho: características, processamento e benefícios à saúde. Trabalho Acadêmico. 2009. 39p. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009. Disponível em > https://quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/alho-caracteristicas-processamento-e-beneficios-a-saude.doc.< Acesso em 05. dez. 2014.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**: Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007 Disponível em >http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf< Acesso em 09 mar. 2015.

EDYVEAN, R.G.J. et al. Interactions between cathodic protection and bacterial settlement on steel in seawater. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v. 29, p.251-271, 1992.

FAN, M.M.; LIU, H.F., DONG, Z.H. Microbiologically influenced corrosion of X60 carbon steel in CO2-saturated oilfield flooding water. **Materials and Corrosion**, Weinheim, Alemanha, v. 64, n.3, p. 242-246, 2013.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; MCNEIL, C.J; RAWSON, K. Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. **Trends in Analytical Chemistry**, Londres, Inglaterra, v.24, n.1, p. 37-48, 2005.

FRANÇA, F.P. Um pólo nacional de pesquisa sobre os biofilmes. França Flash, São Paulo, n. 45, p. 12-13, 2006.

GALVÃO, M.M.; **Efeito do potencial de proteção catódica na corrosão microbiologicamente induzida**. 2008. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GARCIA-GÓMEZ, L.J. e SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Revisión: Efectos cardiovasculares Del Ajo (Allium sativum). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**,v. 50, n.3, p. 219-27, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222000000300002&script=sci_arttext> Acessado em 11 jan. 2015.

GARDNER, L.R e STEWART, P.S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v. 29, p. 354 – 360, 2002.

GENTIL, V. Corrosão. 6ª edição, Editora S.A, Rio de Janeiro, 2011.

GEORGE, R. P.; MARSHALL, D.; NEWMAN, R. C.; Mechanism of a MIC probe. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v. 45, p. 1999-2015, 2003.

GEWEELY, N.S.I. Evaluation of ozone for preventing fungal influenced corrosion of reinforced concrete bridges over the River Nile, Egypt. **Biodegradation**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.22, p.243–252, 2011.

GNEDENKOV, S.V.; SINEBRYUKHOV, S.L.; SERGIENKO, V.I. Electrochemical Impedance Simulation of a Metal Oxide Heterostructure/Electrolyte Interface: A Review. **Russian Journal of Electrochemistry**, Nova Iorque, Estados Unidos, v. 42, n. 3, p. 197–211, 2006.

GONZÁLEZ, J.E.G.; SANTANA, F.J.H; MIRZA-ROSCA, J.C. Effect of bacterial biofilm on 316 SS corrosion in natural seawater by EIS. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v.40, n.12, p.2141-2154, 1998.

GOUDA, V.K.; SHALABY, H.M.; BANAT, I.M. The effect of sulphate-reducing bacteria on the electrochemical behaviour of corrosion resistant alloys in sea water. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v.35, n. 1-4, p. 683-691, 1993.

GRUNDMEIER, G.; SCHMIDT, W. STRATMANN, M. Corrosion protection by organic coatings: electrochemical mechanism and novel methods of investigation. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v. 45 p. 2515–2533, 2000.

GUEZENNEC, J.G. Cathodic Protection and Microbially Induced Corrosion. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, p. 275-288, 1994.

GUIAMET, P.S e GÓMEZ DE SARAVIA, S.G. Laboratory studies of biocorrosion control using tradicional and environmentally friendly biocides: an overview. **Latin American Applied Research**, Argentina, v.35, p. 295-300, 2005.

HARRIS, A.S.D.; JONES, K.J.; LEWIS, J. An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdã, Países Baixos, v. 21, p. 21-30, 1998.

HERRERA, L.K. e VIDELA, H.A Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v.63, p.813-822, 2009.

HERRERA, L.K. e VIDELA, H.A. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, Inglaterra v.63, p. 891–895, 2009.

JAVAHERDASHTI, R. A review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: past, present and future. **Anti-Corrosion Methods and Materials**, West Yorkshire, Inglaterra, v.46, n.3, p. 173-180, 1999.

JAVAHERDASHTI, R. Microbiologically influenced corrosion: an engineering insight. Editora Springer, Austrália, 2010.

JAYARAMAN, A. et al. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.52, p. 267-275, 1999.

KELLY, D.P. e WOOD, A.P. Reclassification of some species of Thiobacillus to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berkshire, Inglaterra, v. 50, p. 511-516, 2000.

KIM, T.; KANG, J.; LEE, H. YOON, J. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. **Water Research**, Oxford, Inglaterra, v. 45, p. 4615 – 4622, 2011.

KORENBLUM, E. et al. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (Cymbopogon citratus) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, Heidelberg, Alemanha, v.4, p.44, 2013.

KUANG, F. et al. Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of carbon steel. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v. 52, p. 6084-6088, 2007.

LANNELUC, I. et al. On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v.99, p.55-65, 2015.

LAVANIA, M. et al. Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by Desulfovibrio vulgaris and Desulfovibrio gigas. **Journal of Environmental Sciences**, Pequim, China, v. 23, n. 8, p. 1394–1402, 2011.

LEE, M. et al. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.87, p. 1109–1118, 2010.

LEE, W. e CHARACKLIS, W.G. Corrosion of Mild Steel Under Anaerobic Biofilm. **Corrosion**, Houston, Estados Unidos, vol.49, n.3, p. 186-199, 1993.

LEONÊZ, A.C. Alho: alimento e saúde. 2008. 41p. Monografia (Especialização em Gastronomia e Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2008. Disponível em: > http://bdm.unb.br/bitstream/10483/327/1/2008_AnaClaudiaLeonez.pdf< Acessado em 11 jan. 2015.

LEUNG, H. Ecotoxicology of Glutaraldehyde: Review of Environmental Fate and Effects Studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, Estados Unidos, v.49, p.26-39, 2001.

LI, B.X. et al. Monitoring microbial attachment in seawater. **Engineering In Life Sciences**, Weinheim, Alemanha, v.4, n.4, p. 358-362, 2004.

LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. An overview of microbiologically influenced corrosion. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v. 37, n. 12, p. 2185-2194, 1992.

LITTLE, B.J.; LEE, J.S.; RAY, R.I. The influence of marine biofilms on corrosion: A concise review. **Electrochimica Acta**, Oxford, Inglaterra, v. 54, p. 2–7, 2008.

LIU, F J. et al. Effect of sulphate reducing bacteria on corrosion of Al–Zn–In–Sn sacrificial anodes in marine sediment. **Materials and Corrosion**, Weinheim, Alemanha, v. 63, n. 5, 2012.

MADIGAN, M.T. et al. Microbiologia de Brock. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAXWELL, S. Controlling Corrosive Biofilms by the Application of Biocides. **Society of Petroleum Engineers**, Texas, Estados Unidos, paper 93172, 2005.

MORENTE, E.O. et al. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, Países Baixos, v.162, p. 13–25, 2013.

MORTON, L.H.G. et al. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v.41, p. 247-259, 1998.

NENCINI, C. et al. Evaluation of Antioxidative Properties of Allium species growing wild in Italy. **Phytotherapy Research Phytother**, Nova Jérsei, Estados Unidos, v. 21, p. 874–878, 2007.

NGUYEN, T.M.P. et al. Biocorrosion of AISI 304 Stainless Steel by Desulfovibrio desulfuricans in Seawater. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, Estados Unidos, v. 47, p.4703–4711, 2008.

OCANDO, L. et al. Evaluation of Sulfate-Reducing Bacteria biofilms in the presence of biocides. **Corrosion 2013 (Nace International)**, Houston, Estados Unidos, paper 2782, 2013.

PAGNIN, S. **Formação de biofilmes em aço superduplex UNS S32750 em sistema dinâmico**. 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais)– Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PAULA, M. S. **Avaliação da corrosão microbiológica do aço carbono 1020 em água do mar sintética na presença de bactérias redutoras de sulfato**. 2008. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PENNA, M. O. **Avaliação de bases ativas biocidas para controle de micro-organismos em sistemas de recuperação secundária de petróleo**. 2004. Dissertação (Mestrado) Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

PEREIRA, S.S.A.A. et al. Inhibitory action of aqueous garlic peel extract on the corrosion of carbon steel in HCl solution. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v. 65, p. 360–366, 2012.

PEREIRA, S.P.P. From sub cellular to community level: Toxicity of glutaraldehyde to several aquatic organisms. **Science of the Total Environment**, Amsterdã, Países Baixos, v.470–471, p. 147–158, 2014.

PÉREZ, E.J. et al. Influence of Desulfovibrio sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v.49, p. 3580- 3597, 2007.

Portal da Galvanização. Corrosão. Disponível em >http://www.icz.org.br/portaldagalvanizacao/galvanizacao-corrosao.php< Acessado em 15 mar. 2015.

POSTGATE, J.R. The sulphate-reducing bacteria. 2. ed., Inglaterra: Cambridge University Press, Cambridge, 1984.

POTEKHINA, J.S. et al. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. **Applied Microbiology Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.52, p.639-645, 1999.

QUEIROZ, J.C. **Desenvolvimento de metodologias para a determinação da atividade biogênica de bactérias redutoras de sulfato**. 2015. 125f. Tese (Doutorado em Química). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

RAJASEKAR, A. e TING, Y-P. Role of Inorganic and Organic Medium in the Corrosion Behavior of Bacillus megaterium and Pseudomonas sp. in Stainless Steel SS 304. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, Estados Unidos, v.50, p. 12534 -12541, 2011.

RÈGE, H. e SAND, W. Evaluation of biocide efficacy by microcalorimetric determination of microbial activity in biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, Países Baixos, v. 33, p.227–235, 1998.

REINSEL, M.A. et al. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, Inglaterra, v.17, p.128-13, 1996.

REIS, M.A. et al. Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.40, p.593-600, 1992.

OH. S.; HASSAN, S.H.A.; GINKEL, S.W.V. A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria. **Sensors and Actuators**, Lausana, Suíça, v. B 154, p.17–21, 2011.

SANO, L.L. Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, Países Baixos, v. 71, p. 283–296, 2005.

SANTANA RODRÍGUEZ, J.J.; SANTANA HERNÁNDEZ, F.J.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, J.E. Study of the electrochemical behaviour of 304stainless steel in postgate medium in the presence and absence of *Desulfovibrio Desulfuricans*. **Materials e Corrosion**, Weinheim, Alemanha, v.57, n.10, p.778-782, 2006.

SARAVIA, S.G. e MELE, M.F.L. Enhancement of glutaraldehyde biocidal efficacy by the application of an electric field. Effect on sessile cells and on cells released by the biofilm.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, Nova Iorque, Estados Unidos, v.21, p. 1077–1081, 2005.

SHENG, X.; TING, Y.; PEHKONEN, S.O. Evaluation of an Organic Corrosion Inhibitor on Abiotic Corrosion and Microbiologically Influenced Corrosion of Mild Steel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, Estados Unidos, v.46, p. 7117-7125, 2007.

SILVA, F.B.; AMADO, R.S.; D'Elia, E. Uso de Copaíba (Copaifera L) como inibidor da corrosão do aço-carbono 1020 em meio de cloreto. XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, L.M. Introdução a análise de sistemas eletroquímicos no domínio da frequência. Apostila. 2008. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013. Disponível em <http://sglab.com.br/sites/geqam/arquivos/apt1.pdf> Acessado em 18 dez. 2014.

SILVA, P. **Utilização de THPS e xantana como estratégia para o controle da corrosão microbiologicamente induzida.** 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2011.

SOWARDS, J.W. e MANSFIELD, E. Corrosion of copper and steel alloys in a simulated underground storage-tank sump environment containing acid-producing bacteria. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v. 87, p. 460–471, 2014.

STAROSVETSKY, D. et al. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. *International Biodeterioration e Biodegradation*, Oxford, Inglaterra, v.47, p.79-87, 2001.

STEFANIE, J.W.H. et al. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdã, Países Baixos, v.15, p.119-136. 1994.

SUTTON, S. The most probable number method and its use in QC microbiology. **Journal of GXP Compliance Autumn**, v.14, p.28, 2010. Disponível em: < http://go.galegroup.com.ez83.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?id=GALE%7CA243459134&v=2.1&u=capes&it=r&p=AONE&sw=w&asid=0b6ed37891bb284658b40ec0239e2d43< Acessado em 17 fev. 2015.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, Lausana, Suíça, v. 44, p. 73–94, 2009.

Taxonomie des Procaryotes. Disponível em: > http://garciajeanlouis9051.perso.neuf.fr/aaBXIII4_O3.html< Acesso em: 03. Abr. 2015

VALCARCE, M.B.; SÁNCHEZ, S.R.; VÁZQUEZ, M. Localized attack of copper and brass in tap water: the effect of *Pseudomonas*. **Corrosion Science**, Oxford, Inglaterra, v. 47, p.795–809, 2004.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2009.

VIANA, M.G. et al. Avaliação da atividade do óleo essencial de Lippia gracilis Schauer sobre biofilmes formados em sistema dinâmico. **INTERCORR ABRACO**, Ceará, 2010.

VIDELA, H. A. Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 2003.

VIDELA, H.A. Prevention and control of biocorrosion. International Biodeterioration & Biodegradation, Oxford, Inglaterra, v.49, p.259-270, 2002.

VIDELA, H.A e HERRERA, L.K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**, Barcelona, Espanha, v. 8, p. 169-180, 2005.

WANG. H. et al. Corrosion of carbon steel C1010 in the presence of iron oxidizing bacteria Acidithiobacillus ferrooxidans. **Corrosion Science**, v.89, Oxford, Inglaterra, p.250–257, 2014.

WEN, J. et al. A green biocide enhancer for the treatment of sulfate-reducing bacteria (SRB) biofilms on carbon steel surfaces using glutaraldehyde. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v.63, p.1102–1106, 2009.

WOLYNEC, S. Técnicas eletroquímicas em corrosão. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

XU, C. et al. Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bactéria. **Materials Science and Engineering**, Lausana, Suíça, v.443, p. 235–241, 2007.

XU, C. et al. Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. **Materials Characterization**, Nova Iorque, Estados Unidos, v. 59, p. 245-255, 2008.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. A synergistic D-tyrosine and tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate biocide combination for the mitigation of an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.28, p. 3067–3074, 2012.

XU, L.; CHAN, K.; FANG, H.H.P. Application of atomic force microscopy in the study of microbiologically influenced corrosion. **Materials Characterization**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.48, p.195– 203, 2002.

YUAN, S.J. e PEHKONEN, S.O. Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic Pseudomonas NCIMB 2021 bacteria: AFM and XPS study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdã, Países Baixos, v. 59, p. 87–99, 2007.

ZALEPUGIN, D.Y. et al. Application of Supercritical Fluid Extraction to the Development of New Potential Biocides on the Basis of Garlic (Allium sativum L.) **Russian Journal of Physical Chemistry B**, Nova Iorque, Estados Unidos, v.4, n. 7, p. 1103–1111, 2010.

ZARASVAND, K.A e RAI, V.R. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, v. 87, p. 66-74, 2014.

ZINKEVICH, V. et al. Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. **International Biodeterioration& Biodegradation**, Oxford, Inglaterra, p.163-172, 1996.