



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Rodrigo Sant'Anna Fonseca

**Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em aço carbono
1020 por bactérias redutoras de sulfato**

Rio de Janeiro

2018

Rodrigo Sant'Anna Fonseca

Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato

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

Orientadora: Dalva C. B. do Lago

Orientadora: Lilian F. de Senna

Orientadora: Márcia Monteiro Machado Gonçalves

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

F676 Fonseca, Rodrigo Sant'Anna
Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em
aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato / Rodrigo
Sant'Anna Fonseca. – 2018.
98 f.

Orientadora: Lilian Ferreira de Sena
Orientadora: Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Orientadora: 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. Sena, 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.

bs CDU 620.193

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rodrigo Sant'Anna Fonseca

Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em aço carbono 1020 por Bactérias Redutoras de Sulfato

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Lilian Ferreira de Senna (Orientadora)

Instituto de Química– UERJ

Prof^a. Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves (Orientadora)

Instituto de Química – UERJ

Profa. Dra. Dalva Cristina Baptista do Lago (Orientadora)

Instituto de Química – UERJ

Profa. Dra. Simone L. D. Cezar Brazil

Escola de Química – UFRJ

Dr. Walter B. C. Júnior

Instituto Nacional de Tecnologia – INT

Profa. Dra. Marta A. Pereira Langone

Instituto de Química– UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, professores orientadores e técnicos por toda a paciência e incentivo em todos os momentos possíveis.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Dalva Lago, Lilian Senna e Márcia Gonçalves pelo carinho e dedicação que tem com sua profissão e seus respectivos alunos. Sempre fazem tudo a seu alcance para nos incentivar, ensinar, acalmar e fazer querermos ser melhores profissionalmente. Logo, ao longo do tempo, desenvolvi grande admiração pelas profissionais e pessoas que vocês são e, por isso, lhes agradeço muito por toda a ajuda e por estar me ajudando a trilhar meu caminho.

À minha aluna de iniciação científica, Victoria Castro, por acreditar no trabalho desenvolvido e tentar absorver o máximo da experiência aprendida nos ensaios.

Aos meus familiares, Lais e Reinaldo, por toda a dedicação de tempo sempre me passando confiança e nunca pedindo nada em troca a não ser a minha felicidade.

À minha noiva, Lais Monteiro, a certeza de que você tornou essa jornada mais possível, humana, agradável e mitigou todas as possibilidades de desmotivação ao longo do caminho.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por ter feito parte desse passo importante na minha carreira e, por isso, mora no meu coração.

E finalmente, ao restante da minha família e amigos, sem quem nada disso faria sentido algum.

RESUMO

FONSECA, Rodrigo Sant'Anna. *Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em aço carbono 1020 por Bactérias Redutoras de Sulfato*. 2018. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O desenvolvimento industrial crescente favoreceu, ao longo do tempo, a utilização de instalações metálicas enterradas e submersas como, por exemplo, oleodutos, gasodutos, navios, tanques de armazenamento e plataformas de petróleo. Consequentemente, os problemas associados à corrosão aumentaram e acabaram fomentando o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para o controle e combate deste processo. O objetivo dessa dissertação é avaliar o uso de biocidas naturais no controle da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) do aço carbono AISI 1020 por bactérias redutoras de Sulfato (BRS). Inicialmente, o comportamento da CMI no aço foi avaliado em água do mar sintética, em condições de anaerobiose, na presença de uma cultura de *Desulfovibrioalaskensis*. Alguns biocidas naturais (óleo de alho, lúpulo e extrato de nim) e outro comercial (glutaraldeído) foram utilizados para controlar a corrosão causada por estas bactérias. A varredura dos potenciais biocidas foi realizada através da análise do crescimento microbiano na superfície do aço, com a quantificação das BRS sésseis pelo método do número mais provável (NMP). Esta varredura inicial consiste na inoculação de reatores contendo os corpos de prova (CP) e os biocidas naturais, por períodos variando de 0 a 7 dias, visando a seleção daqueles biocidas mais promissores. Os resultados mostram que os biocidas lúpulo e extrato de nim tiveram melhores resultados na inibição do crescimento microbiano. Em seguida, o comportamento eletroquímico do aço no meio contendo os biocidas selecionados e também o biocida comercial, foram estudados por meio das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) usando sempre água do mar sintética como meio eletrolítico. Ao analisar os resultados, o lúpulo foi o biocida que apresentou resultados melhores que o extrato de nim. Ele manteve o OCP relativamente inalterado minimizando o 'enobrecimento' do CP e dificultando a formação do biofilme. Além disso, na fase exponencial do crescimento microbiano, ele apresentou maior resistência à transferência de carga e menores valores de capacitância da dupla camada elétrica sugerindo a formação de um biofilme protetor na superfície do CP. Além disso, ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados para visualizar a presença ou não do biofilme no CP dos ensaios com biocida em 4 e 7 dias. Nele, verificou-se diferentes morfologias dos filmes formados entre o lúpulo e extrato de nim. No caso do glutaraldeído, observa-se uma superfície com dificuldade na formação dos biofilmes.

Palavras-chave: Biocidas naturais. Corrosão microbiologicamente induzida. Bactérias redutoras de sulfato. Número mais provável. Aço carbono.

ABSTRACT

FONSECA, Rodrigo Sant'Anna. *Evaluation of natural Biocides on the control of microbiologically influenced biocorrosion of 1020 carbon steel by Sulfate Reducing Bacteria*. 2018. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The growing industrial development has favored, during time, the employment of metallic installations buried and submerged, such as oil and gas pipelines, ships, storage tanks and oil platforms. Consequently, the problems related to corrosion increased and encouraged the development and the improvement of techniques for control and combat this process. This dissertation's goal is to evaluate the use of natural biocides in the control of the MIC of carbon steel AISI 1020 by sulfate reducing bacteria (SRB). Initially, the MIC behavior in steel was evaluated in synthetic sea water, in anaerobiosis with a culture of Sulfate Reducing Bacteria (SRB). Some natural biocides (garlic oil, hop and neem extract) and other commercial (glutaraldehyde) will be used to control corrosion caused by those bacteria. The scanning of potential biocidal products was realized through analysis of microbial growth in steel surface, with quantification of SRB by the most probable number (MPN) method. This initial scan consists in inoculation of reactors containing the test specimens and the natural biocides by periods varying from 0 to 7 days for the selection of those most promising biocides. The results show that the biocides: hop and neem extract had better response in inhibition of microbial growth. Subsequently, the electrochemical behavior of the steel in environment with the selected biocides and the commercial biocide as well, were studied by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), always using synthetic sea water as electrolytic environment. When analyzing the results, hop presented better response comparing to neem extract. It kept the OCP relatively unchanged, minimizing 'ennobling' of the samples and making biofilm formation difficult. Besides that, in the most accentuated phase of microbial growth it showed bigger resistance to charge transfer and smaller values of double layer electric capacitance suggesting the formation of a protective biofilm on the sample surface. In addition, scanning electron microscopy were realized in order to visualize the presence or not of biofilm in sample surface in the tests with biocide in 4 and 7 days. In those tests, different morphologies of the films were observed between the hop and neem extract. In the glutaraldehyde's case, observed a surface with difficulty in the adhesion and formation of the biofilms was observed.

Keywords: Natural biocides. MIC. SRB. MPN. Carbon steel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Custos diretos de Corrosão divididos por setores produtivos.....	17
Figura 2 - Diagrama de Pourbaix para a água	18
Figura 3 - Exemplo de pites de acordo com a ASTM	22
Figura 4 - Exemplo de corrosão intergranular em aço inox	23
Figura 5 - Esquema de corrosão microbiológica	24
Figura 6 - Metabolismo das bactérias com reações a base de enxofre	26
Figura 7 - Exemplo da <i>Thiobacillus denitrificans</i>	27
Figura 8 - Formato da <i>Desulfovibrio alaskensis</i>	28
Figura 9 - Diagrama do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	30
Figura 10 – Exemplo de Cultivo de lúpulo e da flor do lúpulo	38
Figura 11 - Tipos de corpos de prova utilizados (A) Corpo de prova utilizado para os ensaios eletroquímicos e (B) Corpo de prova utilizado para os ensaios de quantificação microbiana.	44
Figura 12 - Esquema sequencial da preparação dos CP's.....	44
Figura 13 - Biorreator contendo o meio Baar.....	47
Figura 14 - Organização do ensaio de quantificação microbiana.....	49
Figura 15 - Esquema exemplificando a inoculação dos CP's	51
Figura 16 - Esquema para realização da quantificação microbiana	51
Figura 17 - Quantificação microbiana das BRS aderidas ao substrato metálico durante o período de incubação.	56
Figura 18 – Evolução do potencial de circuito aberto (OCP) para os sete dias de ensaio em meios sem biocida ou contendo lúpulo, extrato de nim ou glutaraldeído	59
Figura 19 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 24 horas de incubação	61
Figura 20 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 48 horas de incubação	62
Figura 21 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 72 horas de incubação	63
Figura 22 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 96 horas de incubação	Erro! Indicador não definido.
Figura 23 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 120 horas de incubação	Erro! Indicador não definido.

Figura 24 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 144 horas de incubação	Erro! Indicador não definido.
Figura 25 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bodè (B) e Diagrama de Fases (C) para os ensaios com 178 horas de incubação	Erro! Indicador não definido.
Figura 26: Circuitos elétricos equivalentes utilizados nas simulações.....	68
Figura 27 – Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) em todas as condições	72
Figura 28 – Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) em todas as condições	73
Figura 29 – Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência à transferência de carga (R_{tc}) em todas as condições.....	74
Figura 30: Microscopia da superfície do aço carbono 1020 para os ensaios com o biocida glutaraldeído após 04 dias (A), 7 dias (D), Microscopia da superfície do aço carbono 1020 para os ensaios com o biocida extrato de nim após 04 dias (B), 7 dias (E), Microscopia da superfície do aço carbono 1020 para os ensaios com o biocida lúpulo após 04 dias (C), 7 dias (F)	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos usados como substratos	31
Tabela 2 - Resumo de artigos encontrados na literatura (Fonte: O autor, 2017).....	34
Tabela 3 - Composição química - Alho in natura.....	36
Tabela 4 - Composição química - lúpulo seco	39
Tabela 5 - Composição do nim.....	41
Tabela 6 - Composição do aço-carbono AISI 1020	43
Tabela 7 - Composição da água do mar sintética	45
Tabela 8 - Composição do Meio Baar	46
Tabela 9 - Composição do Meio Postgate E.....	48
Tabela 10 - Composição da solução de diluição	48
Tabela 11 - Concentração dos biocidas nos ensaios.....	50
Tabela 12: Resultados de simulação dos Circuitos Elétricos Equivalentes.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS	Adenosina Fosfosulfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado
EFC	Elemento de Fase Constante
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
$F_{\text{máx}}$	Frequência máxima
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NMP	Número Mais Provável
OCP	Potencial de Circuito Aberto (Open CircuitPotential)
PIB	Produto Interno Bruto
R_e	Resistência do eletrólito
R_{tc}	Resistência de transferência de carga
SPE	Substância Polimérica Extracelular
THPS	Sulfato de TetraquishidroximetilFosfônio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 CORROSÃO.....	16
1.2 CONDIÇÕES DO PROCESSO CORROSIVO	18
1.2.1 <u>Materiais susceptíveis à Corrosão</u>	19
1.2.2 <u>Meios Corrosivos.....</u>	19
1.2.2.1 <u>Águas Naturais</u>	20
1.2.2.2 <u>Solos</u>	20
1.3 Formas de Corrosão presentes na Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI).	21
1.3.1 <u>Corrosão uniforme</u>	21
1.3.2 <u>Corrosão puntiforme</u>	21
1.3.3 <u>Corrosão por placas</u>	22
1.3.4 <u>Corrosão intergranular</u>	23
1.4 Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI)	23
1.5 Biofilmes	25
1.6 Micro-organismos envolvidos no processo biocorrosivo	25
1.6.1 <u>Bactérias do ciclo do enxofre</u>	26
1.7 Metabolismo das bactérias redutoras de sulfato	29
1.8 Métodos de prevenção e controle da biocorrosão	31
1.8.1 <u>Biocidas</u>	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 CORPOS DE PROVA (CPs)	43
2.2 Preparação dos CPs para os ensaios	44
2.2.1 – Ensaio de quantificação celular e MEV	44
2.2.2 <u>Ensaio eletroquímicos</u>	44
2.3 Fluido de Processo e Meio de Cultura	45
2.3.1 <u>Ensaio de quantificação microbiana</u>	47
2.4 Biocidas	50
2.5 Ensaio com biocidas	51

2.6 Ensaios de quantificação microbiana	51
2.7 ENSAIOS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)	52
2.8 ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Seleção de biocidas por meio da quantificação microbiana	55
3.2 Ensaios eletroquímicos	58
3.2.1 <u>Potencial de Circuito Aberto (OCP)</u>	58
3.2.2 <u>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)</u>	60
3.3 Ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
CONCLUSÃO	84
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS	88

INTRODUÇÃO

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é aquela em que o material suscetível à corrosão se processa sob influência de micro-organismos (GENTIL, 2011). Ela também pode ser definida como o processo eletroquímico de dissolução metálica iniciado ou acelerado por micro-organismos, sem modificar as características da reação. Tem-se, então, um processo anódico de dissolução metálica, concomitante a um processo catódico dependente das características do meio corrosivo (VIDELA, 2003).

Bactérias, que são os micro-organismos estudados nessa dissertação, estão espalhadas no meio ambiente e apresentam tendência em aderir a superfícies, desde que existam condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Tal interação, entre as bactérias com os materiais susceptíveis à corrosão, resulta na formação de biofilmes, que afetam a cinética de reações catódicas e/ou anódicas de um processo corrosivo (Cheng et al., 2006).

Os principais micro-organismos associados a CMI são as bactérias. As mais estudadas são as bactérias redutoras de sulfato (BRS), as oxidantes de enxofre, as oxidantes do ferro e as formadoras de exopolímeros. Entre todas, as BRS são o principal grupo envolvido nos casos de biocorrosão. Estas bactérias causam corrosão em estruturas metálicas, revestimentos de poços petrolíferos, partes externas de tubulações enterradas, poços de água profundos, sistemas de resfriamento, dentre outros (GENTIL, 2011).

As BRS possuem certa facilidade em serem detectadas, pois o processo metabólico gera como produto o gás sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é tóxico e corrosivo ao ambiente (MIRANDA et al., 2006).

Devido ao uso crescente de estruturas metálicas no cotidiano, o impacto financeiro causado pelos processos biocorrosivos têm fomentado a pesquisa para realizar detecção, tratamentos preventivos e corretivos das estruturas metálicas.

Logo, é de suma importância compreender o comportamento das BRS na corrosão de aços com a finalidade de mitigar os danos causados pela CMI por meio de algumas alternativas como, por exemplo, os biocidas.

A maioria dos biocidas utilizados comercialmente como, por exemplo, cloro, bromo, ozônio e o glutaraldeído, são eficientes no controle da biocorrosão. Mas, a grande maioria deles apresenta como principal desvantagem a sua toxicidade ao meio ambiente e dificuldade de degradação (VIDELA, 2003). Logo, tem-se buscado continuamente a utilização de compostos naturais para, no mínimo, diminuir a utilização de biocidas sintéticos. Algumas

especiarias e legumes como cravo, canela, cominho, tamarindo, alho e cebola vêm sendo testadas com essa finalidade. Na presente dissertação, óleo de alho, extrato de nim e lúpulo foram os compostos avaliados como biocidas naturais. Sua capacidade como biocidas e sua habilidade de proteger os corpos de prova de aço carbono contra a corrosão microbiológica por BRS, foram comparadas com um biocida tradicionalmente usado (glutaraldeído).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ação de biocidas naturais como o lúpulo, extrato de nim e óleo de alho no controle da corrosão microbiológica no aço carbono AISI 1020 em água do mar sintética por *Desulfovibrio alaskensis*, uma bactéria redutora de sulfato (BRS), adquiridas da *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* – NCIMB do Reino Unido e cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz.

Objetivos Específicos

O objetivo desta dissertação é avaliar biocidas naturais como possíveis inibidores de biocorrosão. Os objetivos dessa dissertação podem ser elencados conforme a listagem abaixo:

- Avaliar o impacto da adição dos biocidas lúpulo, extrato de nim, óleo de alho e glutaraldeído no crescimento microbiano de uma cultura de *Desulfovibrio alaskensis*;
- Verificar a formação e morfologia dos biofilmes formados na superfície do aço carbono 1020 por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar o efeito da adição dos biocidas na corrosão microbiologicamente induzida (CMI) por meio de técnicas eletroquímicas, MEV e quantificação microbiana.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico são abordados os principais aspectos teóricos necessários para a contextualização deste estudo.

1.1 Corrosão

A corrosão consiste na transformação, na maioria das vezes espontânea, de um material ou liga metálica através da interação química ou eletroquímica em um determinado meio operacional(GENTIL, 2011).

A Federação Europeia de Corrosão define corrosão como a interação físico-química entre um metal e o meio envolvente, da qual resultam mudanças nas propriedades do metal levando, frequentemente, à sua inutilização ou a do sistema técnico do qual faz parte, ou ainda, à alteração do meio(EUROPEAN CORROSION FOUNDATION, 2017).

Já a NACE – *National Association of Corrosion Engineers* - possui uma abordagem um pouco mais ampla conceituando o termo corrosão como a deterioração de um material ou de suas propriedades devido à reação com o meio envolvente(NACE, 2016).

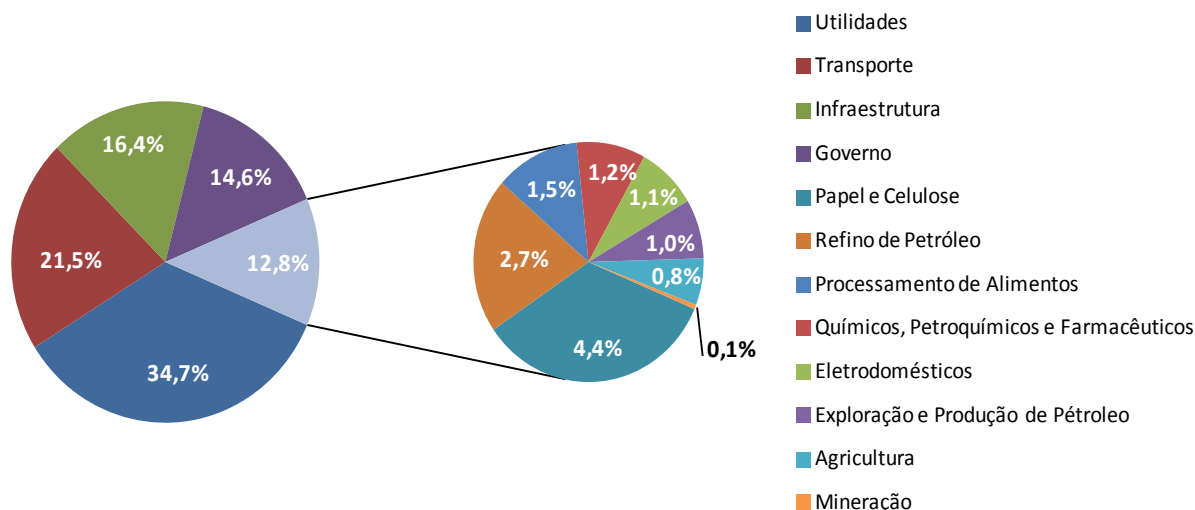
Desse modo, a corrosão também pode ocorrer em materiais não metálicos, como o concreto, borracha e polímeros(GENTIL, 2011).

Essa degradação, geralmente indesejada, ocasiona uma modificação das suas propriedades químicas e estruturais do material, justificando a não utilização futura do mesmo. Esse processo tem como principais consequências a diminuição do tempo de vida útil do material assim como a queda do nível de desempenho(GENTIL, 2011).

Na Figura 1, pode-se observar como os custos com a corrosão estão distribuídos entre os diversos ramos da indústria mundial. Esses custos podem ser classificados como diretos e indiretos. Os custos diretos estão relacionados com a substituição de peças e equipamentos que sofrem corrosão, estando aí inclusas as despesas com energia e mão-de-obra. Além disso, os custos relacionados com a manutenção dos processos de proteção, como a proteção catódica, são diretos. Os custos indiretos são, por muitas vezes, mais elevados do que os diretos, embora sejam mais difíceis de serem mensurados. Eles levam em consideração a

perda de eficiência, perda de produto, paralisações acidentais, contaminação de produtos além do superdimensionamento nos projetos (PERLINGEIRO, 2005).

Figura 1 - Custos diretos de Corrosão divididos por setores produtivos



Fonte: NACE Internacional - The Corrosion Society, 2002

Conforme citou-se anteriormente, sabe-se que grande parte dos materiais que sofrem o processo corrosivo possui perda de suas propriedades tanto físicas quanto químicas e resultado até mesmo na modificação do material. Sabe-se que esta inutilização gerou impactos financeiros da ordem de, aproximadamente, 3,4% do PIB global (US\$2,5 trilhões) no ano de 2013 (NACE, 2016). Vale lembrar que esta estimativa corresponde somente aos custos diretos da corrosão.

Infelizmente, não existem muitas informações a respeito do custo da biocorrosão, tema do presente estudo e que é melhor abordado mais adiante nessa revisão. No entanto, alguns estudos isolados podem ser encontrados, mostrando que, por exemplo, 34% dos custos de corrosão de uma empresa petrolífera são associados a micro-organismos (JACK et al., 1992). Ainda na década de 1960, este tema já causava preocupação uma vez que, em um trabalho realizado no Reino Unido, provou-se que 50% dos custos com corrosão em oleodutos são de origem microbiológica, aproximadamente (BOOTH, 1964). Além desses estudos, estima-se que 20% dos custos de corrosão em materiais metálicos possuem influência microbiológica (FLEMMING et al., 1996). Desse modo, é muito importante o conhecimento do processo corrosivo fomentado por micro-organismos, assim como estratégias para sua mitigação.

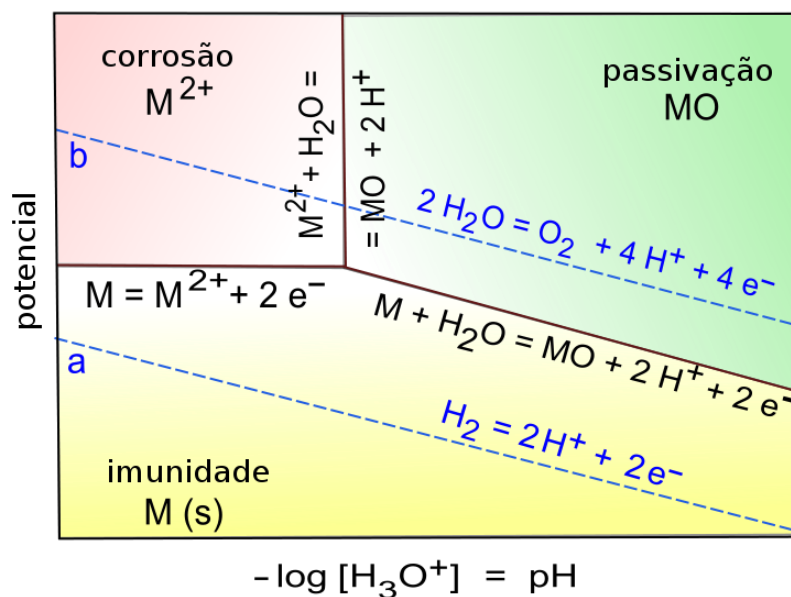
1.2 Condições do Processo Corrosivo

A corrosão depende de três condições para ocorrer:

- Material susceptível a corrosão;
- Meio Corrosivo;
- Condições Operacionais.

Pourbaix (1974) desenvolveu um método gráfico que relaciona potencial e pH, onde é possível prever, com base em equilíbrios termodinâmicos, as condições sob as quais pode acontecer corrosão a partir das condições operacionais, do meio corrosivo e do material susceptível a corrosão por meio da medição dos parâmetros de potencial de circuito aberto e pH. Nos Diagramas de Pourbaix estão representados vários equilíbrios químicos que podem existir entre o corpo de prova (CP) e o eletrólito líquido. Em alguns modelos desse tipo de gráfico, consegue-se distinguir as diferentes regiões de corrosão, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Diagrama de Pourbaix para a água



Fonte:Wikipedia, 2013

O diagrama de Pourbaix acima identifica três regiões distintas: corrosão, imunidade e passivação.

Na região de corrosão, as espécies termodinamicamente favoráveis são as formas iônicas do metal, indicando processos de oxidação. Já na região de imunidade o metal se encontra em sua forma sólida e sem qualquer reação sendo, portanto, essa região é desfavorável à oxidação(GENTIL, 2011).

Na última região, denominada de passivação, existe a formação de produtos com características insolúveis e estáveis, como óxidos ou hidróxidos em fina camada sobre a superfície metálica(GENTIL, 2011).Vale lembrar que grande parte dos metais resistentes à corrosão possuem uma camada de óxido como forma de minimizar a corrosão.SegundoMadigan et al. (2014), esse filme formado pode ter 02 características:

- Aderente e estável: o material é resistente ou imune;
- Solto e frágil: o processo corrosivo não é controlado.

A CMI afeta diretamente o processo corrosivo uma vez que altera as principais variáveis do diagrama de Pourbaix: potencial de circuito aberto e o pH. Estudos recentes como o de Bhola et al. (2014) acompanham a evolução do potencial de circuito aberto com o passar do tempo.

1.2.1 Materiais susceptíveis à Corrosão

Todos os materiais metálicos e alguns não metálicos, como polímeros e concreto, estão susceptíveis ao processo corrosivo que podem ou não ser agravados de acordo com algumas variáveis. As principais variáveis capazes de influenciar a corrosividade são a composição química, presença de impurezas e o contato bimetálico(GENTIL, 2011).

No caso do processo biocorrosivo, os principais materiais envolvidos são aqueles envolvidos no processo de exploração de petróleo como o aço-carbono 1020, aço inoxidável AISI 304 e ligas a base de cobre e estanho (VIDELA, 2003).

1.2.2 Meios Corrosivos

Os principais meios corrosivos são:

- Atmosfera;
- Águas naturais;
- Solos.

Os meios corrosivos onde são encontrados processos de corrosão microbiologicamente induzida (CMI) constam a seguir.

1.2.2.1 Águas Naturais

Os materiais metálicos, quando entram em contato com a água, apresentam tendência a sofrer corrosão. Porém, esse processo é influenciado por vários fatores (pH, temperatura, velocidade e ação mecânica), assim como por diversos contaminantes, tais como gases dissolvidos, sais dissolvidos, sólidos suspensos, matéria orgânica, tanto de origem animal quanto vegetal e bactérias (GENTIL, 2011). Ela é um eletrólito eficiente, devido ao seu alto teor de cloreto, sendo que a presença de oxigênio dissolvido está diretamente relacionada com a agressividade do ataque ao CP (GREEN e PERRY, 1997).

Neste meio, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) se aderem ao CP para, posteriormente, formar uma matriz cujo crescimento é proporcional ao do biofilme (MADIGAN et al., 2014). Muitas delas utilizam o ferro como fonte de elétrons e, como consequência, ele é oxidado formando o íon Fe^{2+} em solução (DUANA et al., 2008).

Em altas concentrações deste íon, ocorre a liberação do gás oxigênio (O_2) gerando uma diferença de concentração de oxigênio neste meio uma vez que os biofilmes formados não crescem de forma homogênea por toda a extensão da superfície (DUANA et al., 2008).

Logo, tem-se uma diferença de concentração de oxigênio dissolvido oferecendo condições para a formação de uma pilha de aeração diferencial onde o início do processo corrosivo é no local onde existe esta diferença de concentração (EUROPEAN CORROSION FOUNDATION, 2017).

1.2.2.2 Solos

O solo, por ser um meio corrosivo que sofre a influência de diversas variáveis, é um dos mais difíceis para a determinação prévia de sua agressividade em materiais metálicos. Essa dificuldade é evidenciada quando se comparam os resultados de diferentes períodos do ano mostrando que os parâmetros físico-químicos mudam com as oscilações climáticas (RENZO, 1985).

Sabe-se previamente que o mecanismo de corrosão no solo é de origem eletroquímica, mas para isso acontecer é necessária, obrigatoriamente, a existência de áreas anódicas e catódicas. Elas podem surgir tanto no material metálico, devido a existência de áreas deformadas ou tensionadas, quanto no meio corrosivo através de taxas diferentes de aeração, em função da variabilidade dos solos (GENTIL, 2011).

Existe um grupo seletivo de bactérias capazes de oxidar enxofre ou seus compostos e gerarem ácido sulfúrico ou sulfatos diminuindo, conseqüentemente, o pH do solo e a resistividade elétrica. Tais bactérias são as bactérias oxidantes de enxofre e redutoras de sulfato. Esse efeito é amplificado quando o solo em questão é de origem argilosa com condições de anaerobiose (GENTIL, 2011). Nesse caso, é possível a presença de bactérias anaeróbicas, como as BRS. Alguns pré-requisitos, além da ausência de oxigênio, têm que existir para que essas bactérias, capazes de influenciar as reações de corrosão microbiológica, possam se desenvolver, tais como a presença de sulfato e nutrientes, temperatura entre 25 °C e 44 °C e pH entre 5,5 e 8,5 (VIDELA, 2003).

1.3 Formas de Corrosão presentes na Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI)

No caso da biocorrosão, objeto de estudo desta dissertação, as formas de corrosão mais presentes são a corrosão uniforme, puntiforme e por placas (BEECH e GAYLARDE, 1999). Também pode ser encontrada na literatura ocorrências de corrosão intergranular (JAMES e HATTINGH, 2015).

1.3.1 Corrosão uniforme

Sabe-se que a corrosão uniforme ou generalizada é aquela que ocorre com maior frequência. Ela se processa em grande parte da superfície do material e, usualmente, visualiza-se uma camada de um óxido metálico formada. Essa forma de corrosão é caracterizada pela perda uniforme de massa resultando numa diminuição da seção transversal da peça podendo gerar a quebra do objeto (NACE INTERNATIONAL, 2017).

Ocorre, principalmente, devido à exposição direta da liga metálica/metal a um meio agressivo na ausência de um sistema protetor (GENTIL, 2011). No caso da CMI, este tipo de corrosão está associado à produção de ácidos orgânicos no processo metabólico das BRS (XU, LI e GU, 2016).

1.3.2 Corrosão puntiforme

Já no caso da corrosão puntiforme ou por pite, esta acontece em pequenos pontos específicos da superfície metálica. Existem três fatores principais que dão início ao processo corrosivo por pite: danos no filme de óxidos protetores, má aplicação de revestimentos e não-uniformidade na superfície da estrutura metálica (NACE INTERNATIONAL, 2017).

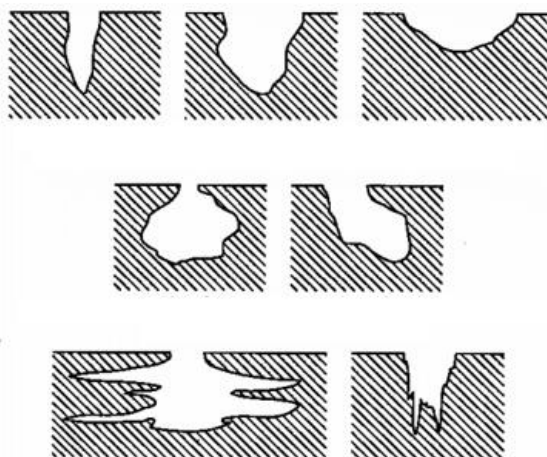
Os danos, tanto físicos quanto químicos, estão ligados diretamente a baixa concentração de oxigênio dissolvido, diminuição do pH e altas concentrações de cloreto (NACE INTERNATIONAL, 2017).

Os pites se apresentam como cavidades com o fundo em forma angular e profundidade maior que seu diâmetro (GENTIL, 2011). Em alguns casos, a cavidade atravessa completamente a espessura de uma chapa metálica (NACE INTERNATIONAL, 2017).

Conforme citado anteriormente, a CMI em água do mar gera uma diferença de concentração de oxigênio podendo gerar a corrosão por pite. Além disso, a formação de biofilmes heterogêneos pode ser um fator acelerador neste tipo de corrosão (DUANA et al., 2008).

Características específicas da corrosão por pites são medidas para uma melhor identificação da morfologia, conforme pode ser observado na Figura 3. As dimensões avaliadas são o diâmetro, profundidade e o número de pites por unidade de área (ASTM, 2002).

Figura 3 - Exemplo de pites de acordo com a ASTM



Fonte: CORROSION CONSULTING SERVICES, 2017

1.3.3 Corrosão por placas

A corrosão por placas fica localizada em regiões da superfície formando placas com escavações. Portanto, os produtos desta reação são formados em placas que se desprendem progressivamente. Seria o caso intermediário entre a corrosão uniforme e a localizada (GENTIL, 2011).

Além disso, é usual em metais utilizados com uma película protetora, já que com o passar do tempo, tornam-se espessas, fraturam e, conseqüentemente, expõe o material a um novo ataque(GENTIL, 2011).

Na CMI, o biofilme formado pode se desprender do CP devido ao efeito da dispersão (MADIGANet al., 2014)expondo a superfície a novos ataques, conformeBatmanghelichet al. (2017) visualizou em seu estudo.

1.3.4 Corrosão intergranular

A corrosão também pode ocorrer no contorno dos grãos da rede cristalina do material metálico, caracterizando a corrosão intergranular ou intercristalina, conforme pode ser visualizado na Figura 4. É um tipo de corrosão bastante perigosa, pois existe grande dificuldade na visualização da mesma, resultando na progressão “silenciosa” do deterioramento do material(RENZO, 1985).

Nesse caso, tem-se a conseqüente perda de suas propriedades mecânicas e possível tendência à fratura. Para a CMI, o mecanismo é semelhante ao da corrosão por pite (DUANAet al., 20018).

Figura 4 - Exemplo de corrosão intergranular em aço inox



Fonte: Gentil, 2011

A corrosão intergranular também pode acontecer nos grãos formadores da rede cristalina. Assim,além da perda de propriedades mecânicas, pode-se ter uma corrosão sob tensão fraturante. Para que haja a sua caracterização, é necessária a existência de três fatores: tensão aplicada, material susceptível e um meio corrosivo(GENTIL, 2011).

1.4CorrosãoMicrobiologicamente Induzida (CMI)

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é aquela em que se processa quando o material suscetível à corrosão está sob influência de micro-organismos(GENTIL,

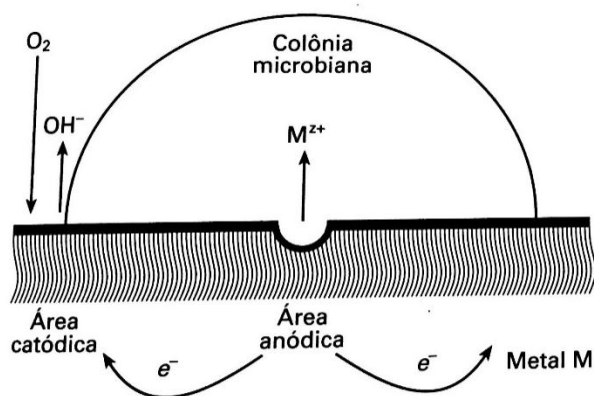
2011). Também pode ser definida como um processo eletroquímico de dissolução metálica iniciado ou acelerado por micro-organismos, sem modificar as características da reação. Tem-se, então, um processo anódico de dissolução metálica concomitante a um processo catódico dependente das características do meio corrosivo (VIDELA, 2003).

Outra definição diz que a corrosão microbiologicamente induzida se refere àquela na qual os micro-organismos influenciam a cinética do processo corrosivo de metais, sendo causada, sobretudo, pelos micro-organismos aderidos na interface dos corpos de prova (BEECH e GAYLARDE, 1999).

Os principais micro-organismos associados a CMI são as bactérias do ciclo do enxofre (redutoras de sulfato e oxidantes de enxofre), bactérias oxidantes do ferro e bactérias formadoras de exopolímeros. Também existem casos de corrosão associados a fungos filamentosos e algas (BEECH e GAYLARDE, 1999).

Todos estes micro-organismos são capazes de modificar a interface metal/solução para facilitar, incrementar e até mesmo inibir, tanto o processo anódico quanto o catódico, conforme exemplo mostrado na figura 5 (VIDELA, 2003).

Figura 5 - Esquema de corrosão microbiológica



Fonte: VIDELA, 2003

Conforme já mencionado, os meios corrosivos que favorecem o crescimento microbiano são aqueles que, em contato com os materiais (principalmente metálicos) também originam este tipo de corrosão: águas naturais (do mar e de rios), águas de sistemas de refrigeração e solos.

1.5 Biofilmes

As bactérias podem ser classificadas em sésseis ou planctônicas. As planctônicas são aquelas que se mantêm no meio em que crescem. Contudo, em meios aquosos onde há escassez de nutrientes, as bactérias tendem a se aderir em vários tipos de superfícies submersas, originando as bactérias sésseis. A partir desta tendência, as bactérias sésseis passam a colonizar estas superfícies formando biofilmes que, quando sobre uma superfície metálica, criam condições susceptíveis à corrosão do material (VIDELA, 2003).

Assim, o termo biofilme refere-se ao desenvolvimento de comunidades microbianas sobre superfícies submersas em ambientes aquosos (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990). São estruturas heterogêneas e dinâmicas onde o número de micro-organismos varia a todo instante (FRANÇA, 2006).

Também é possível considerar o biofilme como uma organização de células bacterianas aderidas a uma superfície, envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células sendo que esta matriz geralmente é composta de polissacarídeos (MADIGAN et al., 2014).

A etapa de formação de biofilme começa na adesão de células em uma superfície inerte. Esta adesão inicia a produção de genes específicos, capazes de sintetizar moléculas de sinalização intercelular com a finalidade de iniciar a produção da matriz. Com essa etapa, as células natatórias perdem seus flagelos. Posteriormente, ocorre a colonização dos micro-organismos, os quais rapidamente se multiplicam e continuam produzindo substâncias poliméricas extracelulares que resultam num crescimento do biofilme (MADIGAN et al., 2014).

A presença de biofilmes tem sido identificada frequentemente como a causa de vários problemas industriais, devido ao fato de ele tornar o ambiente químico na superfície diferente daquele da solução gerando, conseqüentemente, estabilização do processo corrosivo (GEORGE et al., 2003).

1.6 Micro-organismos envolvidos no processo biocorrosivo

Como já mencionado, os principais micro-organismos associados à CIM são: as bactérias do ciclo do enxofre (BRS e oxidantes de enxofre) e as bactérias oxidantes de ferro. Mesmo assim, existem também casos de corrosão associados a fungos e algas. Um exemplo da CIM causada por fungos é o caso de ligas de magnésio em água do mar (QU et al., 2015). Já no caso das algas, existem estudos associados tanto na utilização como inibidores de corrosão em

ligas de alumínio (DENISSEN e GARCIA, 2017) quanto como aceleradoras do processo biocorrosivo (TERRY e EDYVEAH, 1986).

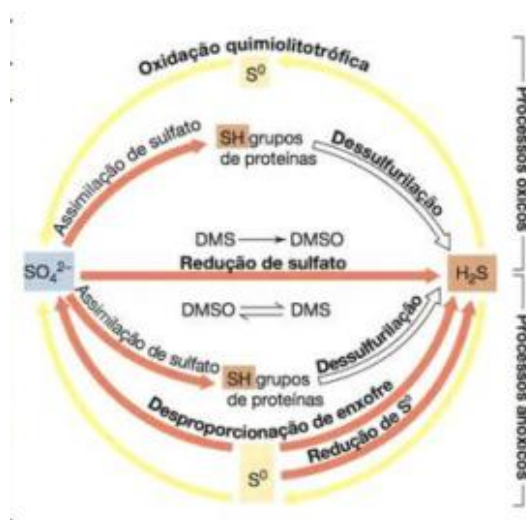
Vale lembrar que esses são os micro-organismos mais pesquisados na literatura no que diz respeito ao processo biocorrosivo e, no caso desta dissertação, as bactérias com reações a base de enxofre são o enfoque principal tendo um detalhamento a seguir.

1.6.1 Bactérias do ciclo do enxofre

As bactérias capazes de sintetizarem o enxofre têm um papel importante na natureza, principalmente no que diz respeito ao ciclo do Enxofre. Os principais agentes envolvidos são as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e as bactérias oxidantes de enxofre. Elas atuam de modo complementar, como pode ser visto na Figura 6.

A principal rota do ciclo do enxofre é a redução do sulfato (SO_4^{2-}) a sulfeto cuja espécie química varia de acordo com o pH do meio. Outras rotas alternativas reduzem o sulfato (SO_4^{2-}) a enxofre elementar (S^0) e, a partir do enxofre elementar, consegue-se realizar a redução a sulfetos. Outra rota encontrada neste ciclo é a assimilação de sulfato seguido da dessulfurilação. Ela é presente nas bactérias do gênero *Desulfovibrio* e uma das formas desse acontecer é por meio da desproporção do enxofre (Madigan et al., 2014).

Figura 6 - Metabolismo das bactérias com reações à base de enxofre



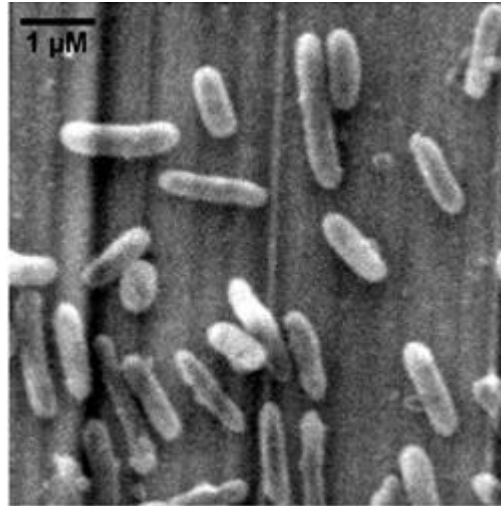
Fonte: MADIGAN et al., 2014

1.6.1.1 Bactérias oxidantes de enxofre

O gênero *Thiobacillus* é o principal gênero envolvido na oxidação de enxofre no que diz respeito ao processo biocorrosivo. As bactérias são aeróbias e utilizam o dióxido de

carbono (CO_2) como fonte principal de carbono. A Figura 7 apresenta um exemplo dessas bactérias.

Figura 7 - Exemplo da *Thiobacillusdenitrificans*



Fonte: GenomePortal, 2017

Como pode ser visualizado na Figura 7, essas bactérias possuem o formato de bacilo, com diâmetro da ordem de $0,5\ \mu\text{m}$ e comprimento variando entre $1,0\ \mu\text{m}$ e $3,0\ \mu\text{m}$. Adicionalmente, sua temperatura ótima de crescimento está na faixa entre 10°C e 37°C , propiciando seu desenvolvimento em mares e rios (VIDELA, 2003).

A faixa ideal de pH para o crescimento destas bactérias é entre 6 e 8, sendo possível para as mesmas utilizar o nitrato como aceptor de elétrons. Portanto, tal bactéria pode ser classificada como aeróbia facultativa (Madigan et al., 2014).

A correlação com o processo biocorrosivo está relacionada à enzimas específicas, ligadas a um sistema de transporte de elétrons em que o oxigênio atua como receptor final (VIDELA, 2003).

1.6.1.2 - Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As BRS são os principais micro-organismos envolvidos no processo biocorrosivo (JAVAHERDASHTI, 1999) justificando, portanto, a maior quantidade de estudos realizados para mitigar a biocorrosão causada por tais bactérias (VIDELA, 2003).

Existe uma variação em relação à morfologia das BRS, podendo ser de formato oval, esférico, bacilos e vibriões. Já o seu tamanho, varia de uma faixa entre $0,4$ a $3,0\ \mu\text{m}$ de diâmetro e $3,0$ a $5,0\ \mu\text{m}$ de comprimento, sendo encontradas isoladas, em pares ou agregadas.

Em grande maioria são gram-negativas e possuem mobilidade por meio de um flagelo, polar, ou não(VIDELA, 2003).

As BRS são micro-organismos anaeróbios sendo que algumas são tolerantes ao oxigênio(Brune et al., 2000) e podem, até mesmo, sobreviver por períodos longos de exposição a este gás. O seu desenvolvimento se dá, principalmente, em temperaturas mesófilas (30°C a 45°C), embora existam algumas que crescem em temperaturas superiores a 70°C (ANDRADE, 2013). Já quanto ao pH, estas bactérias se desenvolvem nos ambientes que possuem uma faixa entre 7,0 e 7,8 sendo que algumas ainda toleram uma faixa mais ampla com variação entre 5,5 a 9,0(Madigan et al., 2014).

Estas bactérias foram classificadas, inicialmente, em dois grupos: o grupo I contempla as bactérias do gênero *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobus*, *Desulfomonas*; o grupo II compreende os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcinae* e *Desulfonema*(Madigan et al., 2014).

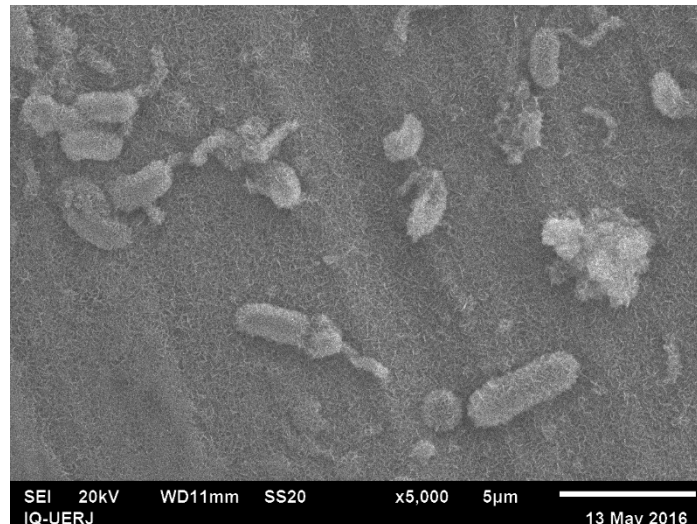
A principal diferença entre esses grupos está nos possíveis doadores de elétrons. O grupo I pode utilizar lactato, piruvato, etanol ou alguns ácidos graxos, enquanto o grupo II especializou-se na utilização de acetato e outros ácidos graxos para reduzir o sulfato a sulfeto de hidrogênio (Madigan et al., 2014).

Devido à facilidade de ser isolado, o gênero *Desulfovibrio* é o mais estudado. São bactérias gram negativas, mesófilas, em forma de víbrios ou bacilos(JAVAHERDASHTI, 1999). A 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).

1.6.1.2.1 - *Desulfovibrio alaskensis*

A bactéria redutora de sulfato utilizado nessa dissertação é a *Desulfovibrio alaskensis*, a qual pode ser observada na micrografia da Figura 8. Recebeu este nome devido ao fato de ter sido descoberta em um poço de Petróleo na Baía de Purdu (Alaska). É uma bactéria gram-negativa, com o formato de um bacilo e possui um flagelo único e polar (FEIO et al., 2004). Além disso, consegue se propagar em temperaturas variando de 10°C a 45°C e suportar uma faixa de pH entre 6,5 e 8,5 (FEIO et al., 2004).

Figura 8 - Formato da *Desulfovibrio alaskensis*



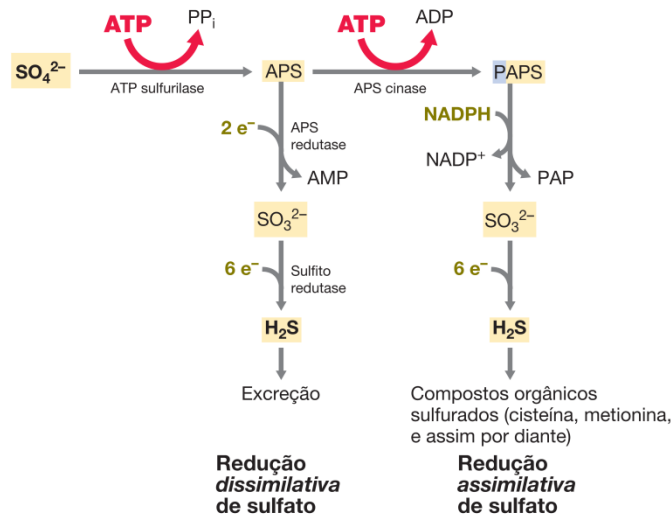
Fonte: O autor, 2017

1.7 Metabolismo das Bactérias Redutoras de Sulfato

Uma parte importante deste estudo é o entendimento do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato do grupo I, da qual faz parte a *Desulfovibrioalaskensis*, para avaliar os possíveis impactos dos biocidas nos meios de cultura utilizados. Inicialmente, necessita-se de uma fonte de carbono e, um dos possíveis doadores de elétrons, pode ser o lactato de sódio ($C_3H_5NaO_3$). Este é oxidado a Piruvato de sódio ($C_3H_3NaO_3$) e, posteriormente, a acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$) para, finalmente, gerar o gás carbônico (CO_2) e os elétrons necessários para a fase subsequente. É válido ressaltar que existem diversas rotas metabólicas possíveis para gerar doadores de elétrons e a citada anteriormente é somente uma entre elas (ODON e SINGLETON, 1993).

A redução do sulfato (SO_4^{2-}) para o sulfeto (S^{2-}) é por meio de sistema de transporte de elétrons (Madigan et al., 2014). A Figura 9 mostra um resumo deste metabolismo. Um aspecto interessante do gênero *Desulfovibrio* é que as proteínas envolvidas no transporte de elétrons são solúveis e citoplasmáticas, diferente do que é visto normalmente na maioria das rotas metabólicas.

Figura 9 - Diagramado metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS)



Fonte: MADIGAN et al., 2014

As reações que transformam o sulfato (SO_4^{2-}) em bissulfito (HSO_3^{-1}), conforme pode ser visto na Figura 9, são desfavorecidas termodinamicamente e, portanto, necessitam de uma energia de ativação por meio da ATP. No caso das bactérias do gênero *Desulfovibrio*, a ativação do sulfato (SO_4^{2-}) se dá por meio do consumo de energia das ligações fosfoanidrido do ATP. Porém, esse processo já consome toda energia gerada na oxidação do lactato a acetato. Logo, as bactérias deste gênero necessitam de algum transportador de elétrons para que a fosforilação oxidativa seja realizada (ODON e SINGLETON, 1993). A grande controvérsia diz respeito à redução do íon bissulfito (HSO_3^{-1}) a sulfeto (S^{2-}). Na literatura, existem inúmeras possibilidades, mas a mais difundida é a redução em uma única reação (PECK JR. e LEGALL, 1982) utilizando a enzima bisulfitoreductase (MADIGAN et al., 2014).

A Tabela 1 demonstra uma série de compostos específicos utilizados como substrato para as BRS. Para cada um desses compostos, existem rotas reacionais de metabolização específicas.

Tabela 1 - Compostos usados como substratos

Classe do Composto	Composto Específico
Inorgânico	Hidrogênio, Monóxido de Carbono
Hidrocarbonetos	Alcanos (C ₁₂ a C ₂₀)
Ácidos Monocarboxílicos	Acetato, butirato, isobutirato, propionato, formato, 2-metil-butirato, 3 metil-butirato, piruvato, lactato
Ácidos dicarboxílicos	Succinato, fumarato, malato, oxalato
Álcoois	Metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, isobutanol, 2-propanol, 2-butanol, etileno-glicol, glicerol
Aminoácidos	Glicina, serina, alanina, cisteína, cistina, valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamato, fenil-analina, treonina
Açúcares	Frutose, glicose, xilose, manose, ramnose
Compostos Aromáticos	Benzoato, fenol, 2-,3- e 4-hidroxibenzoato, p-cresol, catecol, resorcinol, hidroquinona, pirogallol, 2-4-dihidroxibenzoato, 3-4-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato, 4-aminobenzoato, anilina, fenilacetato, vanilato
Outros	Acetona, Oxamato, fulfural, di-hidroxiacetona, ciclo-hexanona, ciclohexanol, betaina, colina

Fonte: Odon e Singleton, 1993

Vale lembrar que, para cada um desses compostos, existem rotas reacionais específicas para metabolizar cada um.

1.8 Métodos de prevenção e controle da biocorrosão

O uso de métodos para prevenir e controlar a biocorrosão é essencial para minimizar as consequências sobre o material exposto ao processo. Para que a escolha de um método seja adequada, é necessário conhecer todas as características do sistema como o material susceptível a corrosão, o meio corrosivo e todas as suas possíveis condições operacionais. Os mecanismos utilizados devem considerar duas importantes questões:

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

- A alteração das características do ambiente em que o processo de corrosão está presente.

Logo, é possível enumerar alguns métodos passíveis de serem utilizados como, por exemplo: procedimentos de limpeza, uso de revestimentos orgânicos, proteção catódica e tratamentos químicos (VIDELA, 2003). Como esta dissertação tem foco na utilização de biocidas como inibidores de corrosão, foi explorada a utilização destes compostos.

1.8.1 Biocidas

O uso dos biocidas para prevenir, inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos, é o método mais aplicado no controle e prevenção da biocorrosão (VIDELA, 2003). Para estes tipos de compostos, existe uma divisão em bactericidas capazes de matar micro-organismos e bacteriostáticos, capazes de inibir o crescimento (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998).

Para a seleção do biocida a ser utilizado no meio, alguns critérios têm de ser levados em consideração como eficácia, capacidade de penetrar e dispersar o biofilme microbiano, compatibilidade química e física com outros produtos e com o ambiente, segurança durante o manuseio e armazenamento, biodegradabilidade comprovada e baixo custo (SARAVIA, 2005).

Outros aspectos relevantes que impactam bastante na escolha do biocida são os micro-organismos presentes no meio de cultura e as condições operacionais como concentração do biocida, tempo de contato e pH (Cloete et al., 1998).

Conforme citado anteriormente nesta dissertação, as bactérias podem ser tanto sésseis quanto planctônicas. O principal interesse é geralmente na ação dos biocidas em relação às bactérias sésseis, uma vez que essas são as principais responsáveis pela biocorrosão. Esse processo de inibição é limitado, pois existem mecanismos naturais de defesa das populações microbianas aderidas à superfície do material. Um desses mecanismos é a formação de uma camada de polissacarídeos (Lavania et al., 2011).

Outro fato relevante diz respeito à forma de aplicação dos biocidas no meio, à qual pode ser feita tanto por meio de uma adição contínua de pequenas quantidades, quanto de adições periódicas de grandes quantidades. A segunda possibilidade elimina rapidamente as células presentes e tem a sua eficácia melhorada quando se utiliza mais de um biocida de forma alternada (GENTIL, 2011). Entretanto, existem pesquisas mostrando que a única forma de

prevenir completamente a colonização de bactérias em uma superfície é por meio de aplicação constante de biocida. Contudo, esta possibilidade pode superar os custos para substituição do sistema a ser protegido (MAXWELL, 2005).

Os biocidas dividem-se entre os oxidantes e não-oxidantes. Dentre os oxidantes, pode-se citar o cloro, bromo, ozônio e peróxido de hidrogênio. Já como não-oxidantes, os principais exemplos são o glutaraldeído ($C_5H_8O_2$), compostos de amônio quaternários como o cloreto de benzalcônio, isotiazolinas e o THPS ($C_8H_{24}O_{12}P_2S$) (VIDELA, 2003).

Devido à alta toxicidade de alguns biocidas citados anteriormente como o glutaraldeído e as isotiazolinas, a busca por biocidas alternativos têm se tornado frequente. A Tabela 2 apresenta alguns potenciais biocidas, sendo eles naturais ou não, e seus efeitos no crescimento bacteriano.

Tabela 2 - Resumo de artigos encontrados na literatura

Micro-organismos	Biocida	Conclusões	Referência
<i>Leuconostocmesenteroides</i>	Lúpulo (beta-ácidos) e goma de pinho	Os beta-ácidos oriundos do lúpulo e a goma de pinho possuem melhor resultado na inibição de crescimento em bactérias mesofílicas da ordem de 30%.	(BEDDIE et al., 2002)
<i>Desulfovibriodesulfuricans</i> subsp. <i>Aestuarii</i>	Glutaraldeído e EDDS	Altas dosagens de glutaraldeído (10ppm) e EDDS (2000 ppm) diminuíram o tempo para a cultura alcançar a fase estacionária. Para o EDDS, não se visualizou bactérias sésseis aderidas no CP, ao contrário do glutaraldeído.	(WEN et al., 2009)
<i>Desulfovibriovulgaris</i> e <i>Desulfovibrio gigas</i>	Urina de vaca	A concentração de HS produzido nas amostras com urina de vaca foram 90% menores do que nas amostras com formaldeído e glutaraldeído.	(LAVANIA et al., 2011)
Bactérias encontradas no ambiente	Extrato de lúpulo beta-bio 45	O extrato de lúpulo reduziu em 52% a concentração inicial de bactérias no meio.	(LEITE et al., 2013)
<i>Desulfovibrioalaskensis</i> , <i>Desulfovibrioafrianus</i> sp. e <i>desulfomicrobium</i> sp.	Extrato de nim (Azadirachtin) - 4% p/p BRS	O extrato de nim reduziu a biocorrosão em aproximadamente 50%, minimizando o crescimento celular e posteriormente suprimindo a produção de sulfeto e o desenvolvimento de biofilmes.	(BHOLA et al., 2014)
<i>Chlorella</i> e <i>Stichococcus</i> e <i>Pleurocapsa</i>	Extrato de erva-moura, células filtradas do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> T22, bactéria <i>Burkholderia gladioli</i>	O tratamento reduziu o crescimento durante o primeiro mês de incubação, mas depois da terceira aplicação (30 dias) ele favoreceu a expansão dos biofilmes.	(SASSO et al., 2016)
Fungos encontrados em monumentos de pedra	Anis estralado e cravo	O cravo diminui a quantidade de fungos encontrados na superfície do corpo de prova.	(JEONG et al., 2017)

Fonte: O autor, 2017

Nessa dissertação, os biocidas utilizados foram o glutaraldeído, lúpulo, extrato de nim e óleo de alho. Nas próximas seções, detalhes a respeito da morfologia, natureza e uso destes biocidas são abordados.

1.8.1.1 – Glutaraldeído

O glutaraldeído, também conhecido como pentanodial, é um líquido com ponto de fusão em -14°C e de ebulição em 188 °C. Além disso, é biodegradável, hidrofílico e não é bioacumulativo. Contudo, afeta a saúde humana, sendo seus principais efeitos a irritação e aumento de sensibilidade da pele, olhos e asma (INCHEM, 2017).

Na indústria, esse biocida é utilizado de diversas maneiras, como desinfetante na medicina diagnóstica (JETTE et al., 1995), em sistemas de filtração de água, com a finalidade de adicionar características antibacterianas (HEYDARIFARD et al. 2018), e como biocida na indústria do petróleo (WEN et al., 2009), por exemplo.

O glutaraldeído é utilizado como composto ativo em uma grande variedade de biocidas comerciais aplicados no controle de fungos, algas e bactérias, incluindo aí as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e biofilmes microbianos. Possui eficácia em amplas faixas de temperatura e de pH (VIDELA, 2003).

A atividade biocida do glutaraldeído se deve à interação do composto químico com a célula por ligações covalentes com as camadas proteicas externas da célula afetando, assim, a permeabilidade celular. Isso impede o transporte de nutrientes para a célula, assim como a remoção de produtos residuais da célula tendo como consequência a morte celular (SANO et al., 2005). O glutaraldeído apresenta eficácia tanto contra as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas. Nas gram-positivas, reage com o peptidoglicano e ácido teicóico da parede celular, enquanto que nas gram-negativas reage com as lipoproteínas da membrana externa, impedindo o metabolismo celular (CLOETE et al., 1998).

1.8.1.2 Alho

O alho (*Allium sativum*) é um vegetal amplamente utilizado na culinária. Porém, também é utilizado como medicamento por causa da sua capacidade antimicrobiana, antioxidante, entre outras. A parte mais importante do alho são os bulbilhos, conhecidos popularmente como ‘dentes’. Estes formam o bulbo do alho, que possui em sua composição enxofre em uma faixa de 0,04 a 0,37% m/m, nas formas de dissulfeto de

dialila, trissulfeto de dialila, sulfóxido de S-alilcisteína, além de outros compostos voláteis (LEÔNEZ, 2008).

A Tabela 3 abaixo detalha a composição química do alho in natura, para uma porção de 100 gramas.

Tabela 3 - Composição química - Alho in natura

Composto	Quantidade (mg)
Glicídios	29300
Proteínas	5300
Lipídios	200
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: CRIZEL, 2009

Os compostos alicina e garlicina são aqueles associados às características antimicrobianas haja vista que possuem atividade bacteriostática e atuam tanto nas bactérias gram-positivas quanto nas gram-negativas (CRIZEL, 2009). Existem ainda compostos não sulfurados como as saponinas, as escordininas e os ácidos fenólicos com propriedades antibacterianas (SÁNCHEZ-MUNIZ e GOMEZ, 2000).

Existem estudos avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos de alho e de cebola para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. As concentrações utilizadas variam de 50 a 500 mL.L⁻¹, sendo que o resultado final indicou uma ação antimicrobiana satisfatória do extrato de alho em detrimento ao extrato de cebola (BENKEBLIA, 2004).

Em outro estudo com extrato de alho, verificou-se que, em concentrações de 2 a 5 mL.L⁻¹, o extrato apresentou resultados antibactericidas para a bactéria *Helicobacter pylori* (CAÑIZARE et al., 2004).

Alguns compostos sulfurados do alho, como a alicina (C₆H₁₀OS₂), foram isolados para teste de seu efeito antibacteriano em meios contendo as bactérias *Candida utilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aurantiaca* e *Escherichia coli*. Os resultados mostram um tratamento eficaz contra as duas últimas bactérias (ZALEPUGIN et al., 2010).

Também existem estudos em que o extrato da casca de alho liofilizado é utilizado como inibidor de corrosão para o aço carbono em solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, em concentrações na faixa de 100 a 400 mg.L⁻¹. O resultado, comprovado por ensaios de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrou que o aumento da proteção do substrato de aço estava diretamente relacionado ao aumento da concentração do extrato utilizado (PEREIRA et al. 2012).

Segundo Silva (2015), a adição do óleo de alho reduz em 30% a quantidade de células séssis em comparação com o ensaio sem biocida para o tempo de 06 dias. Além disso, os resultados sugerem que o óleo de alho forma um filme na superfície do material inibindo, assim, o processo corrosivo.

1.8.1.3 Lúpulo

O lúpulo, cujo nome científico é *Humulus lupulus*, pertence à família da canabáceas e é nativo das regiões temperadas do hemisfério norte. Atualmente, os principais centros de produção encontram-se no Reino Unido, Bélgica, Alemanha, República Tcheca, China, Tasmânia, Polônia, Rússia e Nova Zelândia (MONFREDA et al., 2008).

É uma planta trepadeira, conforme pode ser visto na Figura 10. Comercialmente, o lúpulo pode ser adquirido nos formatos de pellet, inteiros e extrato.

Figura 10—Exemplo de Cultivo de lúpulo e da flor do lúpulo



Fonte: HomebrewersAssociation, 2017

O uso do lúpulo na produção de cerveja foi iniciado na Inglaterra a partir do século XVI e atualmente corresponde à destinação de grande parte da produção mundial. Além da cerveja, outras formas de uso vêm sendo testadas com sucesso. Um exemplo é a utilização do chá de lúpulo como remédio para tratamento de ansiedade, irritabilidade e problemas de insônia (FEDOTOVA et al., 2007).

Além das possibilidades citadas acima, o extrato de lúpulo é amplamente utilizado na indústria cosmética como aditivo em loções corporais. A sua composição química genérica pode ser visualizada conforme a Tabela 4.

Os α -ácidos mais comuns são a humulona, adhumulona, cohumulona, posthumulona e prehumulona. Ao ser realizada a fervura no processo de produção de cerveja, os α -ácidos são isomerizados e convertidos a iso- α -ácidos tendo o cis-isohumulona e a trans-isohumulona como os seus principais produtos. Os iso- α -ácidos possuem efeito bacteriostático somente nas bactérias gram-positivas como as bactérias lácticas e as do gênero *Pediococcus claussen* (LANGEZAAL et al., 1992).

Os β -ácidos mais frequentes no lúpulo são a lupulona, co-lupulona, e adlupulona (HIERONYMUS, 2012). Além disso, existem outros três compostos com o radical prenyl nos β -ácidos presentes nos lúpulos, que estão diretamente relacionados com o poder bacteriostático do composto (KEUKELEIRE, 2000).

Tabela 4 - Composição química - lúpulo seco

Composição química – lúpulo seco	
(% massa)	
Compostos	Faixa de Presença
H ₂ O (umidade)	8 a 10
Celulose	40 a 50
Proteínas	15
Cinzas	8 a 10
Pectinas	2
Lipídios e ceras	5
Polifenóis	2 a 5
β -Ácidos	0 a 10
α -Ácidos	0 a 22
Óleos Essenciais	0,5 a 4

Fonte: HIERONYMUS, 2012

Conforme foi citado anteriormente, o lúpulo é um agente antibacteriano e diversos estudos foram realizados com a finalidade de testar essa planta para esta finalidade.

Na fermentação alcoólica, por exemplo, existem estudos de determinação das concentrações ideais do extrato de lúpulo. O objetivo do extrato de lúpulo nesse caso seria inibir o crescimento de bactérias não desejadas neste tipo de fermentação. No final do estudo, o extrato de lúpulo apresentou resultados semelhantes ao biocida Kamoran® (LEITE et al., 2013).

Também foi testada a ação antibacteriana do lúpulo e de diversos extratos diferentes de lúpulo utilizando culturas da bactéria *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria é responsável por diversas infecções no corpo humano, como a listeriose. O lúpulo foi utilizado em alguns extratos como os aquosos, cetônicos e etílicos previamente filtrados e centrifugados. Neste estudo, portanto, foram definidas diluições efetivas com a finalidade de garantir o efeito antimicrobiano deste composto (SOLTANI et al., 2013).

Diversos β -ácidos presentes no lúpulo foram avaliados como biocidas na indústria açucareira, com o objetivo de inibir a formação de dióxido de nitrogênio (NO₂)

e de ácido láctico por bactérias anaeróbias contaminantes. O problema em questão é a corrosão dos tanques de aço inox utilizados para armazenagem do produto final. O extrato de lúpulo utilizado neste estudo apresentou resultados satisfatórios, pois reduziram a quantidade de ácido láctico no meio de 700 para 400 mg L⁻¹. Além disso, este extrato funcionou melhor em bactérias termófilas (POLLACHet al., 2002).

1.8.1.4 Extrato de nim

O nim (*Azadirachta indica*), popularmente conhecida como amargosa, é um vegetal da família das *Meliaceae* podendo atingir até 18 metros de altura. Desenvolve-se bem em regiões semiáridas, mas é nativa da Índia e da Birmânia (YATAGAI e KUROSE, 2005).

Sua casca, folha e óleo vêm sendo testados como remédios para diversas doenças desenvolvidas por outras plantas e até mesmo como repelente em alguns casos(PARTIPHANet al., 2017).

A composição química do nim pode ser verificada conforme a Tabela 5.

O composto com maior capacidade bacteriostática, a azadiractina está presentenas sementes e folhas do nim e apresenta efeitos relevantes no que diz respeito à capacidade antimicrobiana, tanto para bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas(YATAGAI e KUROSE, 2005) e a sua concentração é da ordem de 0,15% (Sidhuet al., 2003).

Estudos recentes têm avaliado a utilização do extrato de nim como inibidor de corrosão. Em um desses artigos, o extrato de nimfoi considerado um inibidoreficiente no controle da corrosão microbiológica no cobre em meios ácidos (H₂SO₄) (MARTINEZ e VALEK, 2007).

O extrato de nim também diminuiu em 72% a corrosão em aço carbono em uma cultura mista, contendo *Bacillussubtilis*, *Streptomycesparvus*, *Pseudomonasstutzeri* e *Acinetobacterbaumannii*, tornando-o um inibidor que pode ser utilizado de maneira ampla (PARTIPHANet al., 2017).

Tabela 5 - Composição do nim (folha)

Compostos	% em massa
Ácido Hexadecanóico	33,00
Ácido (Z)-octadec-9-enóico	14,30
5,6-dihidro-2,4,6-trietil-1,3,5-ditiazina	11,60
Metil Oleato	3,80
Eudesmo-7(11)-en-4-ol	2,70
Ácido 9-12-octadecadienoico	2,40
Ácido Tetradecanóico	6,75
Ácido Pentadecanóico	1,23
Ácido 9-Hexadecenóico	1,78
Ácido octadecanóico	2,93
Ácido Tridecanóico	1,39
Heptacosano	1,64
Metil-linolenato	1,02
Pentacosano	4,04
Tricosano	10,08
Metil-palmitato	1,34

Fonte: YATAGAI, 2005

Outras pesquisas identificaram o potencial anti-corrosivo do extrato preparado com as folhas de nim em meios ácidos para outros materiais como o zinco na ausência de BRS(SHARMAet al., 2009).

O extrato produzido por meio das folhas também gera efeitos anticorrosivos em outros meios ácidos, como por exemplo, ácido clorídrico, tendo como material susceptível à corrosão o aço-carbono(NAHLEet al., 2010).

Quanto a sua utilização em meios contendo BRS, o extrato das folhas de nimdiminui a taxa de corrosão em 50% em água do mar artificialem uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato contendo*Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrioalaskensis* e *Desulfomicrobiumasphaeronum*(BHOLAet al., 2014).O extrato das folhas de nimtabémfoi testado em água destilada contendo uma cultura pura de *Arthrobactersulfureus*utilizando o cobre como material susceptível à corrosão. De

acordo com o estudo desenvolvido, concluiu-se que concentrações acima de 3% v/v são suficientes para um menor crescimento microbiano, indicando um efetivo efeito biocida (SWAROOPet al. 2016).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

2.1 Corpos de prova(CPs)

Neste estudo, foram utilizados cupons metálicos de aço carbono AISI 1020 para os todos os ensaios realizados. A composição química, em % massa, do aço se encontra na Tabela 6.

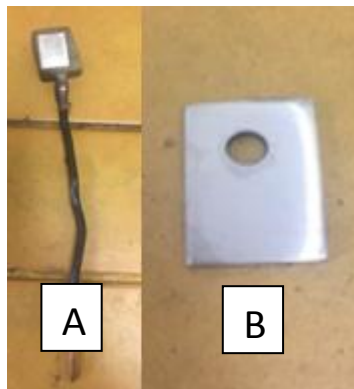
Tabela 6 - Composição do aço-carbono AISI 1020

Elemento	Massa (%)
Carbono	0,16
Manganês	0,63
Fósforo	0,012
Enxofre (máximo)	0,031
Silício	0,012
Cobre	0,01
Cromo	0,03
Níquel	0,01
Ferro	99,105

Fonte: INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS, 2017

Dois tipos de corpos de prova foram utilizados, conforme visualizado na Figura 11. Para os ensaios de impedância eletroquímica utilizou-se o cupom A, enquanto que para os ensaios de quantificação microbiana e microscopia eletrônica de varredura, utilizou-se o cupom B.

Figura 11 - Tipos de corpos de prova utilizados (A) Corpo de prova utilizado para os ensaios eletroquímicos e (B) Corpo de prova utilizado para os ensaios de quantificação microbiana



Fonte: O autor, 2017

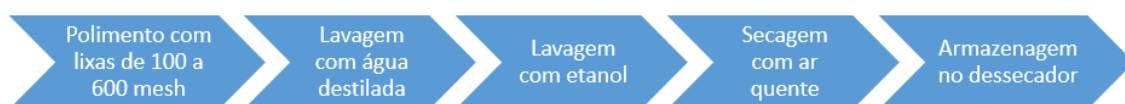
2.2 Preparação dos CPs para os ensaios

A preparação dos corpos de prova não variou muito em relação aos ensaios realizados, conforme est detalhado a seguir.

2.2.1 Ensaio de quantificação celular e MEV

Para estes ensaios, foram utilizados CPs com dimensões em torno de (2 x 1,8 x 0,1) cm e área média de aproximadamente 8 cm². Estes CPs 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. A Figura 12 indica, sequencialmente, os passos para a preparação dos CPs.

Figura 12 - Esquema sequencial da preparação dos CP's



Fonte: O autor, 2017

2.2.2 Ensaio eletroquímico

Para este ensaio, 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, conforme pode ser visto na Figura 11B. Neste caso, foi soldado um fio condutor de cobre em cada cupom metálico para proporcionar a conexão elétrica do sistema. Os CPs foram

embutidos em resina epóxi para garantir que apenas uma de suas faces ficasse exposta ao meio corrosivo. O processo de polimento e limpeza dos eletrodos foi o mesmo usado para os ensaios de quantificação celular.

2.3 Meio de Cultura

A cultura bacteriana utilizada neste trabalho foi uma cultura de *Desulfovibrio alaskensis* adquirida da *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* – NCIMB do Reino Unido.

O eletrólito utilizado para os ensaios eletroquímicos foi a água do mar sintética, cuja composição é descrita na Tabela 7. Além disso, eles foram utilizados para a preparação dos meios de cultura utilizados nos ensaios de quantificação microbiana e microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 7 - Composição da água do mar sintética

Reagentes	Concentração Final (g/L)
Solução 1	
NaF	0,003
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,02
H ₃ BO ₃	0,03
KBr	0,10
KCl	0,70
Solução 2	
CaCl ₂	1,113
Solução 3	
Na ₂ SO ₄	4,00
Solução 4	
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,78
Solução 5	
NaCl	23,50
Solução 6	
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0,02
Na ₂ EDTA	0,010
NaHCO ₃	0,20

Fonte: PAGNIN, 2008

Os componentes de todas as soluções foram dissolvidos em água destilada. A diferença está no volume utilizado na dissolução dos reagentes uma vez que os componentes das soluções 1,4 e 6 foram avolumados em balões volumétricos de 500,00mL e os das soluções 2, 3 e 5 foram avolumados em balões volumétricos de 1,00 L.

Após o preparo das soluções isoladamente, estas foram transferidas para um galão de vidro, no qual foi adicionado mais 500,00 mL de água destilada, completando o volume final de 5,0 L. A solução final foi agitada por 20 horas neste galão e, em seguida, filtrada em membrana Millipore com 0,45µm de porosidade. Em seguida, o volume filtrado foi armazenado em um barrilete.

O meio de cultura utilizado para o cultivo das BRS foi o meio Baar modificado, conforme demonstra a Tabela 8.

Tabela 8 - Composição do Meio Baar

Reagentes	Quantidade
MgSO ₄	2,00 g
Citrato de sódio	5,00 g
CaSO ₄	1,00 g
NH ₄ Cl	1,00 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
Lactato de sódio (50% m/v)	7,00 mL
Extrato de levedura	1,00 g
Solução de resazurina (0,025% m/v)	4,00 mL
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Água do mar sintética	1000 mL

Fonte: Adaptado de ATTC Meio 1249

O tioglicolato de sódio, assim como a solução de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O na concentração de 0,5 g.L⁻¹ previamente filtrada em membrana Millipore com poros de 0,45µm, são inseridas somente antes da inoculação das bactérias redutoras de sulfato ao meio Baar.

O meio foi preparado sob purga de gás nitrogênio, a fim de garantir as condições de anaerobiose. O biorreator contendo o meio pronto, antes da adição do inóculo, apresentou coloração rosa (Figura 13).

Figura 13 - Biorreator contendo o meio Baar



Fonte: O autor, 2017

Além disso, o pH do meio foi ajustado para o valor ideal para crescimento (7,5) por meio da adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para, posteriormente, ser esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para os ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e de microscopia eletrônica de varredura, não são necessários o preparo específico de nenhuma solução. Já o ensaio de quantificação microbiana ainda necessita do preparo do meio Postgate E e da solução de diluição, conforme pode ser visto na seção 2.3.1.

2.3.1 Ensaio de quantificação microbiana

Para realizar os ensaios de quantificação microbiana, foram utilizados dois meios diferentes. Utilizou-se o meio Postate E para indicar a formação de sulfeto de ferro, o qual apresenta a composição mostrada na Tabela 9.

É necessário, ainda, na preparação do meio acima, a correção do pH com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para estabilizar o pH em 7,60. Após a preparação deste meio, 9 mL de alíquota do mesmo foram acondicionados em frascos de penicilina e, posteriormente, lacrados.

Tabela 9 - Composição do Meio PostgateE

Reagentes	Quantidade
KH ₂ PO ₄	0,50 g
NH ₄ Cl	1,00 g
Na ₂ SO ₄	1,00 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	1,00 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,83 g
Lactato de Sódio (50% m/v)	7,00 mL
Acetato de Sódio	2,00 g
Extrato de levedura	1,00 g
Ácido ascórbico	0,10 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g
Ágar	1,90 g
Resazurina (solução 0,025% m/v)	4,00 mL
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Água do mar sintética	1000 mL

Fonte: POSTGATE, 1984

A solução de tioglicolato de sódio foi preparada de forma separada, sob purga de nitrogênio e, posteriormente, esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para o preparo desta solução, utilizou-se 100 mL de água destilada e 1,24 gramas de tioglicolato de sódio. No momento de realizar a quantificação microbiana, adicionaram-se 0,1 mL da solução de tioglicolato em cada vidro de penicilina.

A solução de diluição foi preparada com os reagentes descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição da solução de diluição

Reagentes	Quantidade
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,100 g
Resazurina (solução 0,025% m/v)	4,00 mL
Água do mar sintética	1000 mL

Fonte: POSTGATE, 1984

Assim como o meio postgate E, a solução foi preparada sob purga de nitrogênio e distribuída nos frascos de penicilina. O mesmo procedimento para corrigir o pH até o valor de 7,60 teve que ser feito neste caso. Logo após lacrar os frascos, os mesmos foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

A arrumação dos frascos nas caixas deve ser realizada seguindo o seguinte padrão:

- Três frascos de penicilina preenchidos com o meio Postgate E por fileira;
- Um frasco de penicilina contendo com a solução de diluição por fileira;
- Nove fileiras por ensaio de quantificação.

Logo, usam-se 35 frascos de penicilina por medição, sendo vinte e sete contendo o meio Postgate E e oito contendo a solução de diluição. A Figura 14 exemplifica o ensaio sendo realizado.

Figura 14 - Organização do ensaio de quantificação microbiana



Fonte: O autor, 2017

O resultado positivo para a presença de BRS foi avaliado pela coloração preta nos frascos, devido à formação de precipitado de sulfeto de ferro. Já a coloração rosa indicava um resultado negativo, devido à ausência de crescimento de BRS. A tabela utilizada como referência para a aplicação do método do número mais provável (NMP) foi a utilizada no estudo de (SUTTON, 2010).

2.4 Biocidas

Nesta dissertação, foram utilizados diversos biocidas em concentrações específicas selecionadas de acordo com a literatura.

Segundo Silva (2015), concentrações do óleo de alho na concentração de 3% m/v reduziu o crescimento de BRS aderidas ao substrato em quase 2 ordens de grandeza. Vale ressaltar que, no caso deste biocida, foi adicionado o surfactante laurato de potássio a uma concentração de $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$, haja vista que o óleo não possui miscibilidade em soluções aquosas (SILVA e D'ELIA, 2007).

No caso do glutaraldeído, existem diversos estudos e concentrações encontradas para inibir o crescimento de bactérias sésseis. A concentração utilizada nesta dissertação foi de 0,01% m/v, segundo a proposta de Lavania et al. (2011).

A definição da concentração utilizada no biocida extrato de nim foi de 4% m/v. Segundo Bhola et al. (2014), essa concentração foi suficiente para diminuir a quantidade de bactérias sésseis aderidas ao CP em 04 ordens de grandeza. Além disso, ele estabilizou o potencial de circuito aberto, sugerindo a formação de uma camada protetora no substrato.

Já o lúpulo não havia sido testado para inibir o crescimento de BRS. A proposta foi baseada no estudo de Leite et al. (2013) que definiu como 46 mg/L a concentração ideal do extrato de lúpulo contendo 45% de beta-ácidos. O lúpulo escolhido para simular tal efeito foi o Magnum do fornecedor HBC® e sua escolha foi baseada no maior percentual de beta-ácidos por grama (8% segundo informações do distribuidor). Baseado nas premissas do fornecedor, foi utilizada uma concentração de 40,43 g/L de solução para se alcançar a concentração equivalente a 46 mg/L do extrato de lúpulo.

A tabela 11 abaixo indica das concentrações utilizadas para cada um dos biocidas.

Tabela 11 - Concentração dos biocidas nos ensaios

Biocida	Concentração	Referência
Glutaraldeído Sigma Aldrich®	0,01% m/v	LAVANIA et al. (2011)
Lúpulo Magnum Alemão Safra 2015 HBC®	40,43 g/L	LEITE et al. (2013)

Extrato de Nim Sempre Verde [®]	4% m/v	BHOLA <i>et al.</i> (2014)
Óleo de Alho Alhonat Nativa [®]	3% m/v	SILVA (2015)

Fonte: O autor, 2017

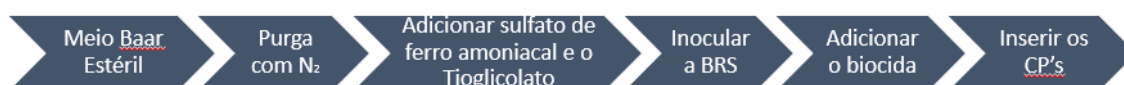
Nesta dissertação, os biocidas receberam tratamento distintos, conforme citado

- Glutaraldeído: diluição até a concentração desejada;
- Lúpulo Magnum Alemão Safra 2015: pellet foi macerado;
- Extrato de Nim Sempre Verde: utilização do extrato puro;
- Óleo de Alho Alhonat Nativa: utilização do extrato com o surfactante laurato de potássio.

2.5 Ensaios com biocidas

Nesta dissertação, os CP foram sempre submetidos ao mesmo tratamento, no que diz respeito à inserção dos mesmos no meio ao meio inoculado. Resumidamente, a Figura 15 detalha cronologicamente os passos para inoculação.

Figura 15 - Esquema exemplificando a inoculação dos CP's



Fonte: O autor, 2017

2.6 Ensaios de Quantificação Microbiana

Após o período de incubação dos CP's (figura 11B) no meio Baar (figura 13), os CP's são retirados e lavados em água destilada com a finalidade de eliminar as bactérias livres. Em seguida, eles são acondicionados em um tubo Falcon contendo 10,00mL da solução de diluição para, posteriormente, serem agitados por quatro minutos no vórtex e depois foram levados ao ultrassom por dois minutos. Após essa preparação prévia, a contagem microbiana é iniciada.

Após a execução destas atividades, 4,0 mL de alíquota são retirados do Tubo Falcon para dar início ao procedimento de quantificação microbiana. A Figura 16 mostra, resumidamente, os passos para realizar o ensaio de quantificação microbiana.

Figura 16 - Esquema para realização da quantificação microbiana



Fonte: O autor, 2017

Com essas alíquotas retiradas, realiza-se a inserção de 1,0 mL da alíquota nos três frascos de penicilina contendo o meio Postgate E e um naquele que contém a solução de diluição. Em seguida, agito o frasco contendo a solução de diluição por trinta segundos no vórtex e retira-se 4,0 mL de alíquota para a próxima fileira, repetindo este procedimento até chegar ao final das nove fileiras.

A redução da população de bactérias sésseis pode ser calculada segundo a equação (1):

$$\% \text{ redução} = \left(\frac{\text{Log (NMP biocida)} - \text{Log (NMP na ausência de biocidas)}}{\text{Log (NMP na ausência de biocidas)}} \right) \quad (1)$$

2.7 Ensaios de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Os ensaios eletroquímicos de EIE do aço carbono 1020 foram realizados inicialmente com 24 horas após a imersão dos CP (conforme figura 11A) no meio corrosivo e, posteriormente, a cada 24 horas até o tempo de 168 horas tanto para os ensaios na presença dos biocidas quanto nos ensaios sem biocidas sendo este critério o mesmo adotado para os ensaios de quantificação microbiana.

Os CPs foram retirados dos biorreatores, lavados em água destilada e, logo em seguida, foram inseridos na solução de água do mar sintética com o mesmo volume (80 mL). Em seguida, uma célula eletroquímica contendo três eletrodos foi montada no potenciostato AUTOLAB Modelo PGSTAT302N da seguinte forma:

1. Eletrodo de trabalho: eletrodo de aço carbono previamente incubado em meio de cultura com BRS contendo ou não biocidas;
2. Eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS);
3. Contra-eletrodo na forma de uma espiral de platina.

Após 30 minutos de estabilização, os ensaios de EIE foram realizados no potencial de circuito aberto, utilizando uma faixa de frequência variando de 10^5 até 10^{-3} Hz, com uma amplitude de 10 mV.

Para melhor interpretação dos dados da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), modelos de circuitos elétricos equivalentes são utilizados com a

finalidade de simular os efeitos das reações na interface eletroquímica e seus impactos, tanto na cinética das reações do eletrodo quanto no transporte de massa (Carvalho et al., 2006). O software Nova 1.10 Metrohm Autolab® foi o utilizado com a finalidade de transformar os dados da EIE em circuitos elétricos equivalentes.

O valor da capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) foi calculado a partir do elemento de fase constante (EFC), dos valores associados ao grau de equivalência do elemento de fase constante para um componente capacitivo (N), da resistência à transferência de carga (R_{tc}) por meio da Equação 2:

$$C_{dce} = (EFC)^{1/N} \times R_{tc}^{(1/N-1)} \quad (2)$$

2.8 Ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada para o corpo de prova exposto ao meio com as bactérias redutoras de sulfato por tempos de imersão de quatro e sete dias. As condições utilizadas contemplam o uso dos biocidas lúpulo, glutaraldeído e extrato de nim no meio biótico antes e após a retirada do filme.

As etapas utilizadas neste procedimento foram a fixação, lavagem, desidratação e a visualização das espécies no microscópio eletrônico de varredura. As etapas de fixação, lavagem e secagem foram realizadas conforme os padrões descritos em Fischer et al. (2012).

Após o tempo de imersão nos meios de cultura, os CPs são retirados e lavados com água destilada. Após, os CPs foram imersos durante uma hora numa solução de glutaraldeído e fosfato básico salino (PBS) com concentrações de, respectivamente, de 3,0% v/v e 0,1 mol L⁻¹. Logo após este tempo, os CPs foram imersos em gradiente de etanol (25%v/v, 50%v/v, 75%v/v e 100%v/v) por 15 minutos cada e seco em estufa a 37°C.

Após este preparo e visualização no MEV, foi realizada a remoção do filme por meio do procedimento de decapagem ácida que consiste na imersão dos CPs na solução de Clark por 02 minutos. Em seguida, esses cupons foram lavados e secos.

Neste caso, o CP não foi levado ao ponto crítico e nem foi realizada a metalização com ouro ou platina. A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM G510 LV em alto vácuo, detector SEI, tensão de 5kV, com aumentos de imagens de 1100X.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de biocidas por meio da quantificação microbiana

O inóculo inicial utilizado possuía uma concentração de $6,75 \times 10^6$ células/mL de uma cultura de *Desulfovibrio alaskensis*. A quantificação microbiana foi feita para as BRS aderidas ao substrato metálico (células sésseis) de 01 a 07 dias de incubação. Os resultados obtidos na quantificação dessas células são apresentados na Figura 17.

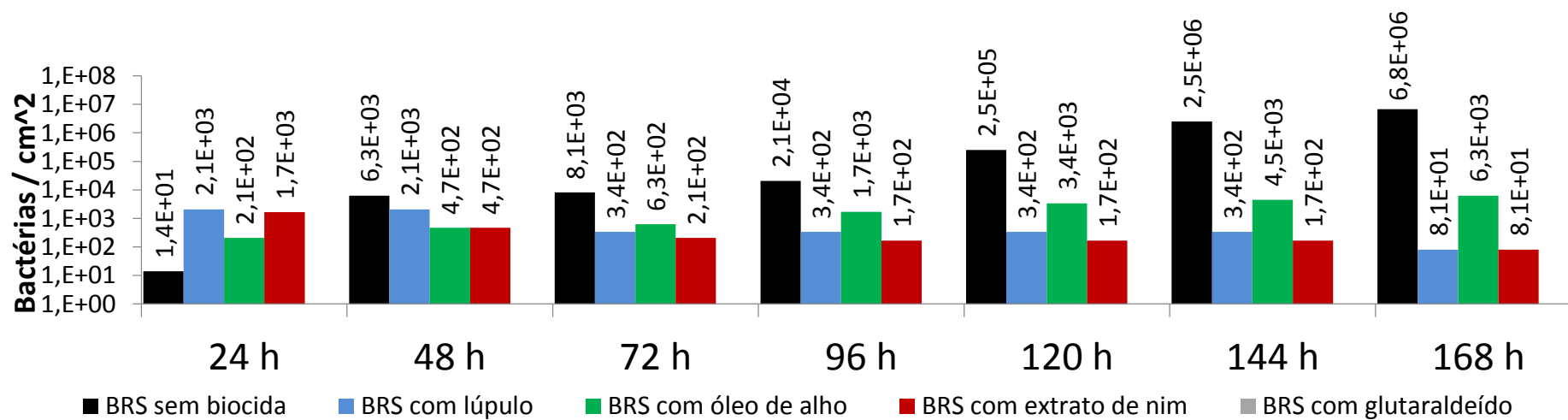
A quantificação microbiana com o óleo de alho para sete dias ($6,3 \times 10^3$ células/cm²) está de acordo com o resultado obtido por Silva (2015) que foi de $4,5 \times 10^3$ células/cm². No caso do extrato de nim, o resultado ao final de sete dias ($8,1 \times 10^1$ células/cm²) é da mesma ordem de grandeza do obtido (10^2 células/cm²) por Bhola et al. (2014). Neste mesmo estudo foram obtidos valores da ordem de 10^7 células/cm² na quantificação de bactérias sésseis na ausência de biocidas, similar àquele encontrado nesta dissertação após sete dias que corresponde a $6,8 \times 10^6$ células/cm².

Resumindo os resultados apresentados no gráfico da Figura 17, pode-se afirmar:

- Meio sem biocida - crescimento das bactérias aderidas ao corpo de prova ao longo do período de incubação;
- Meios contendo tanto lúpulo quanto extrato de nim - crescimento das BRS aderidas ao corpo de prova até o segundo dia superando os resultados do ensaio na ausência de biocidas e, posteriormente, ocorreu uma diminuição da concentração de bactérias sésseis até o último dia de ensaio;
- Meio contendo óleo de alho - crescimento da população de BRS aderida ao corpo de prova até o último dia de ensaio;
- Meio contendo glutaraldeído - não foi visualizado, em qualquer tempo de incubação, o crescimento microbiano.

Para explicar os resultados obtidos, é necessário entender o comportamento do crescimento microbiano. Sabe-se que as bactérias crescem seguindo um comportamento exponencial, alcançando seu máximo crescimento em um período de tempo dependendo do micro-organismo e das condições operacionais do sistema (ZWIETERING et al., 1990).

Figura 17 - Quantificação microbiana das BRS aderidas ao substrato metálico durante o período de incubação.



Fonte: O autor, 2017

Aplicando este conceito para os sistemas utilizados nos presentes ensaios, verificou-se um crescimento acentuado da *D. alaskensis* nos meios contendo biocidas, excetuando-se o glutaraldeído, nas primeiras 24 horas de incubação quando comparado ao ensaio na ausência de biocidas (controle). Este crescimento pode ser explicado devido ao fato destes compostos naturais fornecerem fontes adicionais de carbono acelerando o metabolismo bacteriano.

Nos casos específicos do extrato de nim e lúpulo, o pico de crescimento aconteceu com 24 horas de exposição. Já para os ensaios contendo óleo de alho e na ausência de biocidas, o crescimento das BRS sésseis foi observado ao longo de todo o período de incubação.

Com o passar do tempo de ensaio, alguns fenômenos descritos na literatura podem ser visualizados como, por exemplo:

- Menor resistência ao processo corrosivo conforme relatado por Ramasamy et al (2008);
- Adsorção dos produtos gerados pelo metabolismo das BRS na superfície metálica do CP formando um filme protetor na superfície do CP segundo Alabbaset al. (2013) e Nguyen et al. (2008);
- Adsorção dos biocidas utilizados na superfície do CP formando uma camada orgânica protetora (Bhola et al., 2014);
- Inibição do crescimento microbiano tanto pela ausência de fontes de energia (Mardigan et al., 2014) quanto pelos produtos excretados pelos micro-organismos (H₂S).

De forma resumida, neste ensaio verificou-se uma redução da concentração de BRS sésseis somente para os meios contendo os biocidas naturais extrato de nim e lúpulo. No caso do óleo de alho, é importante notar que, apesar do menor crescimento microbiano em comparação com aquele verificado para o meio sem biocida, esta redução foi bem menor que a observada para os outros dois biocidas naturais testados. Portanto, os resultados obtidos por esses dois potenciais biocidas, extrato de nim e lúpulo, os credenciaram para um estudo mais aprofundado visando a redução da biocorrosão empregando ensaios eletroquímicos. Os resultados mostraram uma inibição de 72% do crescimento de bactérias sésseis nos meios contendo lúpulo e extrato de nim, ao final de sete dias por meio da equação 1.

3.2 Ensaios eletroquímicos

3.2.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)

A Figura 18 exibe o potencial de circuito aberto no aço carbono 1020 em água do mar sintética (pH = 7,6) medido em cada tempo de ensaio. Conforme citado anteriormente, os CPs foram previamente incubados no meio de cultura, na ausência e na presença de biocidas.

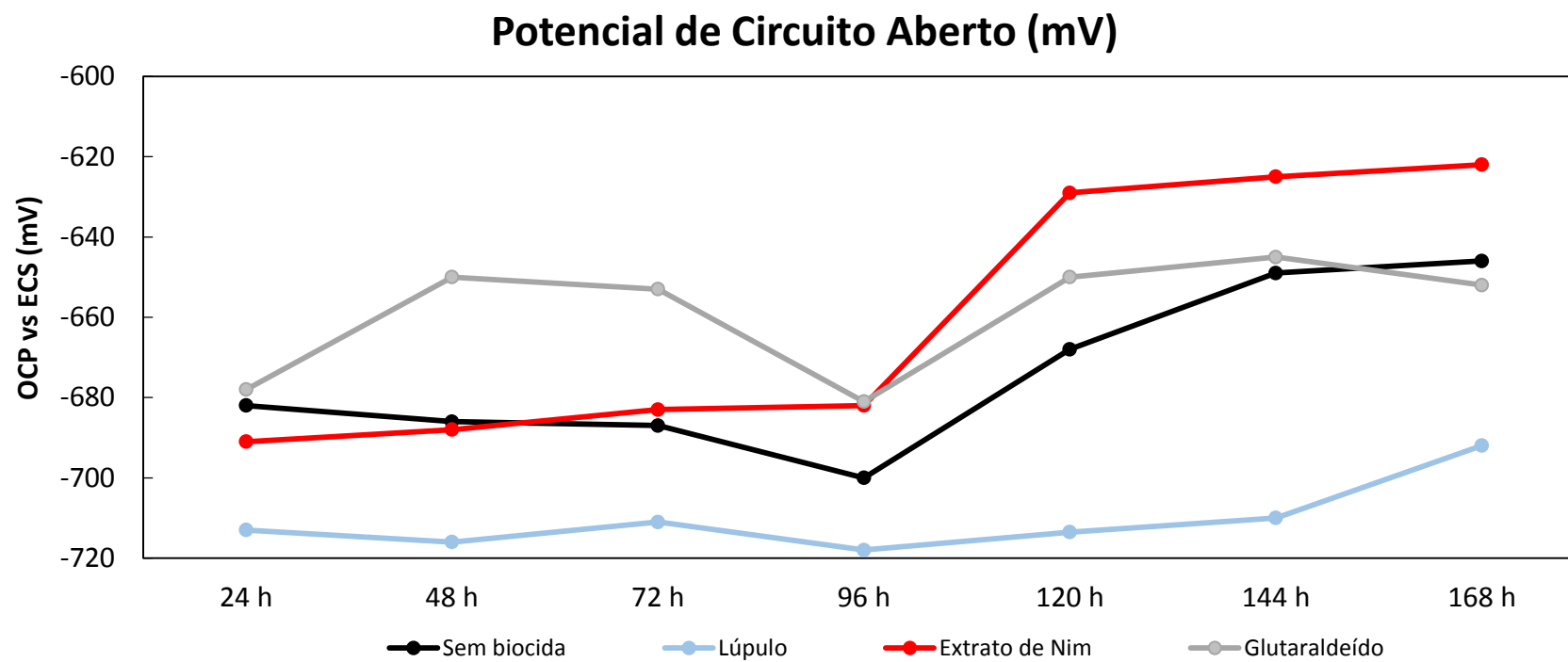
Conforme citado na seção anterior, os biocidas lúpulo, extrato de nim e glutaraldeído foram previamente selecionados para a continuidade dos experimentos.

Todos os ensaios tiveram como resultado o deslocamento do OCP para valores mais positivos, ao final de 7 dias. No caso do CP imerso ao meio sem biocida, isso só ocorre a partir do quarto dia de exposição. Na literatura, esse fenômeno possui a denominação de “enobrecimento” (LITTLE et al., 2008), o qual tem sido atribuído à reprodução e colonização das BRS na superfície do corpo de prova, formando o biofilme e alterando os processos eletroquímicos na superfície (ALABBAS et al., 2013). Além disso, Dickinson et al. (1997) também associou o enobrecimento a atividade biológica no biofilme.

Os ensaios para os corpos de prova previamente imersos no meio contendo o biocida glutaraldeído apresentaram valores mais positivos que o CP imerso no meio sem biocida para todos os tempos. Nas bactérias gram-negativas, como é o caso da *D. alaskensis*, o glutaraldeído impede o metabolismo celular por meio da sua reação com as lipoproteínas da membrana externa (CLOETE et al., 1998) inibindo, assim, o crescimento de bactérias na superfície do CP.

Já o lúpulo apresentou o efeito inverso, pois todos os sistemas no qual o lúpulo estava presente apresentaram valores de OCP mais negativos que o meio na ausência de biocida. Provavelmente, a adição do lúpulo minimizou a ocorrência do fenômeno de “enobrecimento” na superfície do CP sugerindo uma adsorção prévia dos compostos do lúpulo dificultando a formação do biofilme e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de bactérias sésseis, conforme pode ser visto no ensaio de quantificação microbiana por meio da Figura 17. Além disso, a manutenção do OCP nos primeiros seis dias de medição corrobora o efeito inibidor.

Figura 18—Evolução do potencial de circuito aberto (OCP) para os sete dias de ensaio em meios sem biocida ou contendo lúpulo, extrato de nim ou glutaraldeído



Fonte: O autor, 2017

Os resultados do OCP para o extrato de nim mostraram que, a partir do terceiro dia, houve deslocamento do potencial para valores mais positivos quando comparados com os ensaios sem biocidas. O enobrecimento, neste caso, está associado ao mecanismo de formação do biofilme uma vez que a Azadiractina realiza a adsorção dos compostos orgânicos na superfície do metal (PARTIPHANet al., 2017).

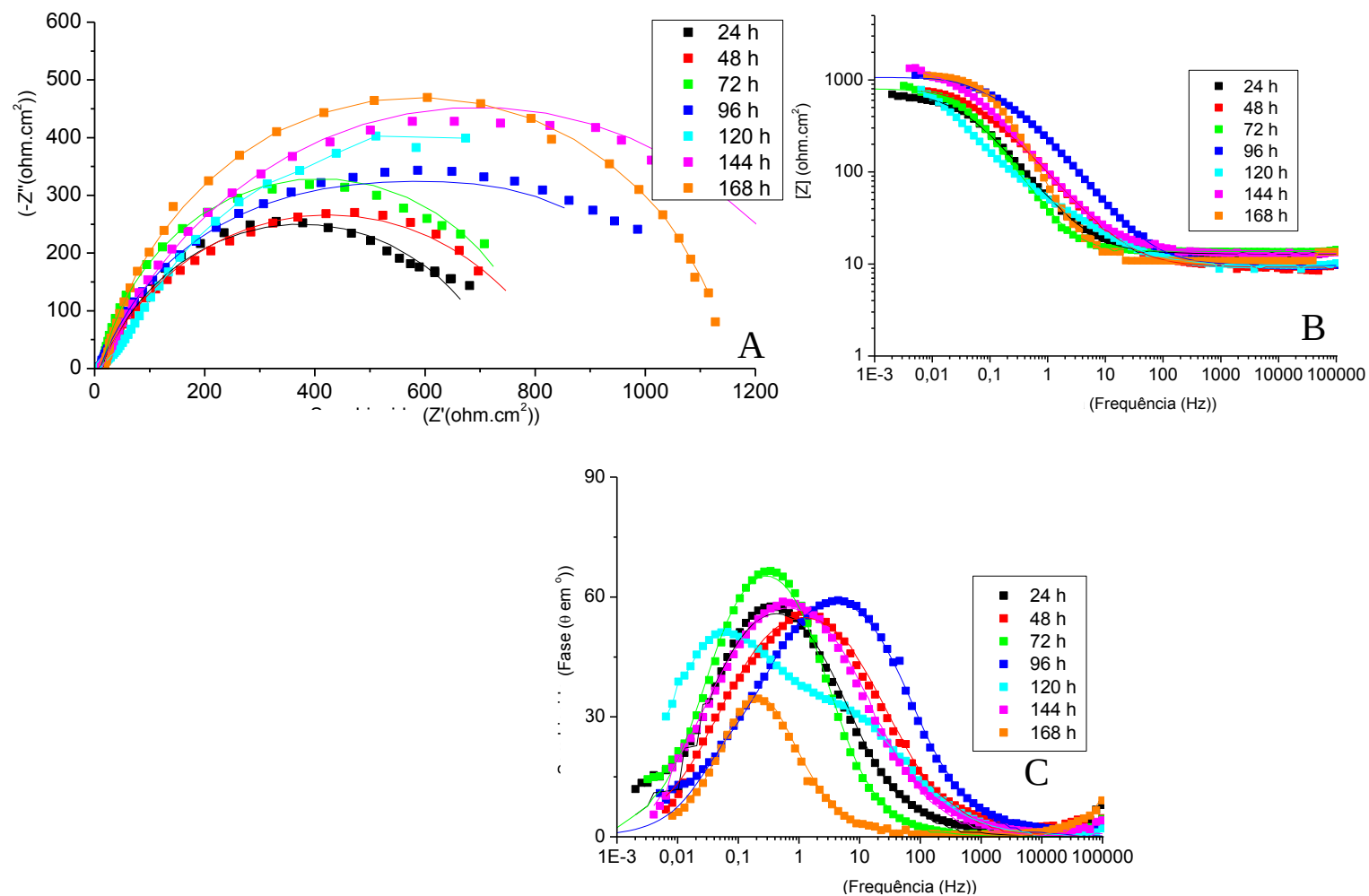
Além dos resultados observados acima, a medição do OCP poderia ser utilizada para identificar tempos para realimentar os biocidas no meio com a finalidade de minimizar o processo biocorrosivo, pois é uma variável facilmente medida. O tempo de realimentação do biocida no meio pode ser aquele associado ao maior aumento do OCP, pois este aumento está associado, muitas vezes, à reprodução, colonização das BRS e expansão dos biofilmes na superfície do corpo de prova (ALABBAS et al., 2013).

3.2.2 – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

As Figuras 19 a 22 exibem os diagramas de Nyquist, Bode e de fases do aço carbono 1020 medido para cada ensaio na ausência e na presença de biocidas. Os resultados foram agrupados de acordo com as condições comuns para analisar tais efeitos com o passar do tempo.

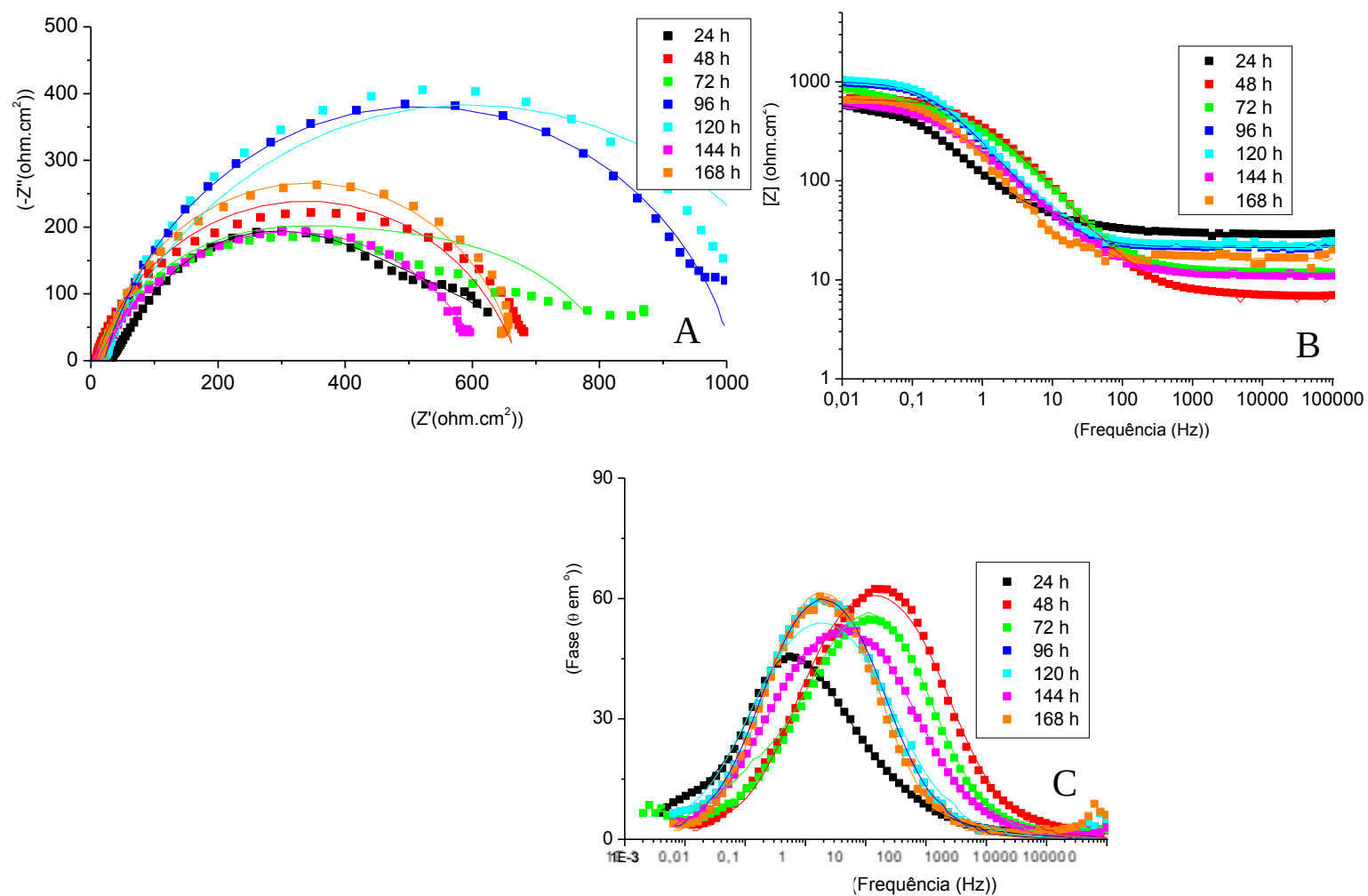
.

Figura 19 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bode (B) Diagrama de Fases (C) para os ensaios bióticos na ausência de biocidas



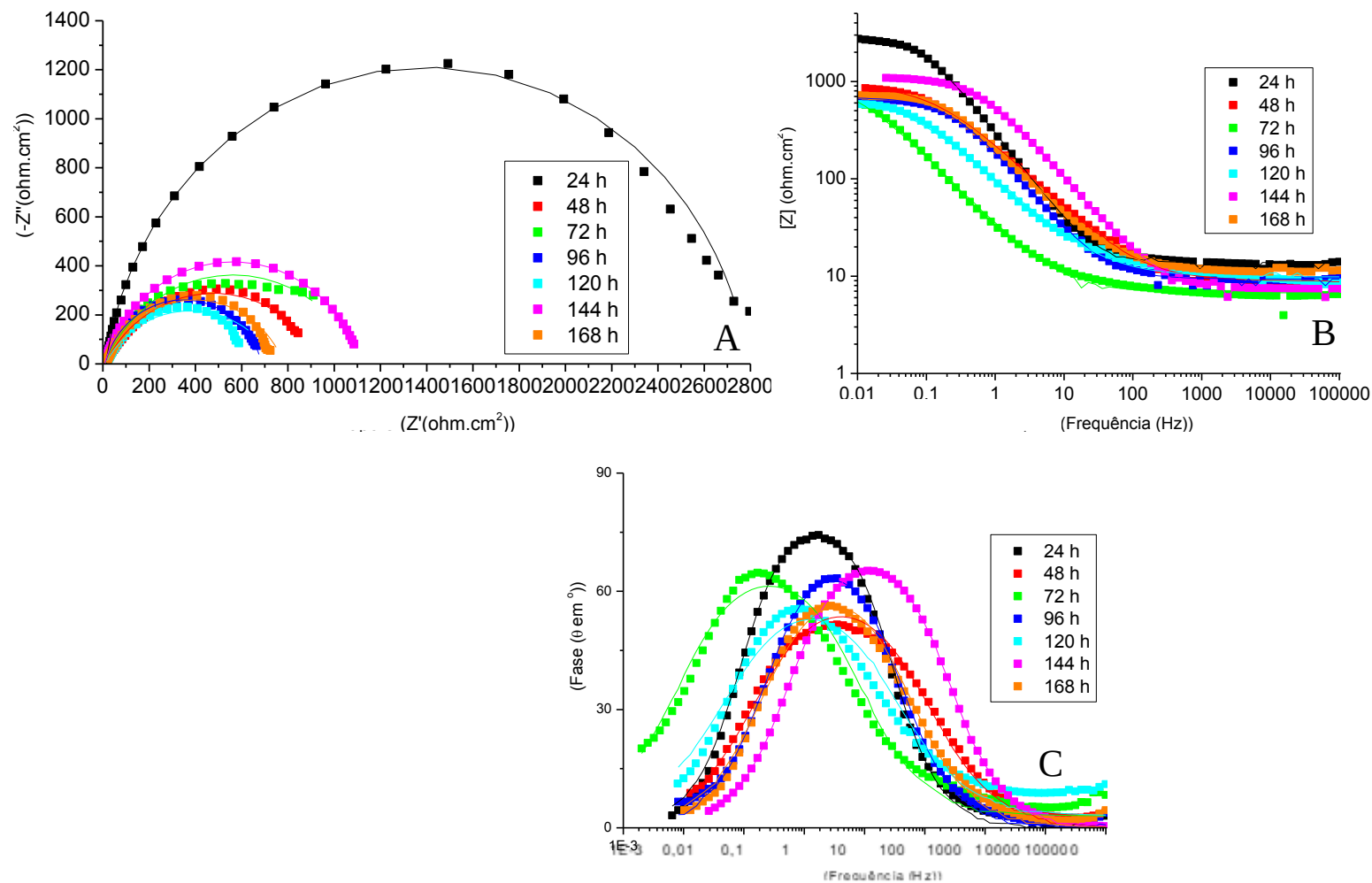
Fonte: O autor, 2017

Figura 20 -Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bode (B) Diagrama de Fases (C) para os ensaios com glutaraldeído



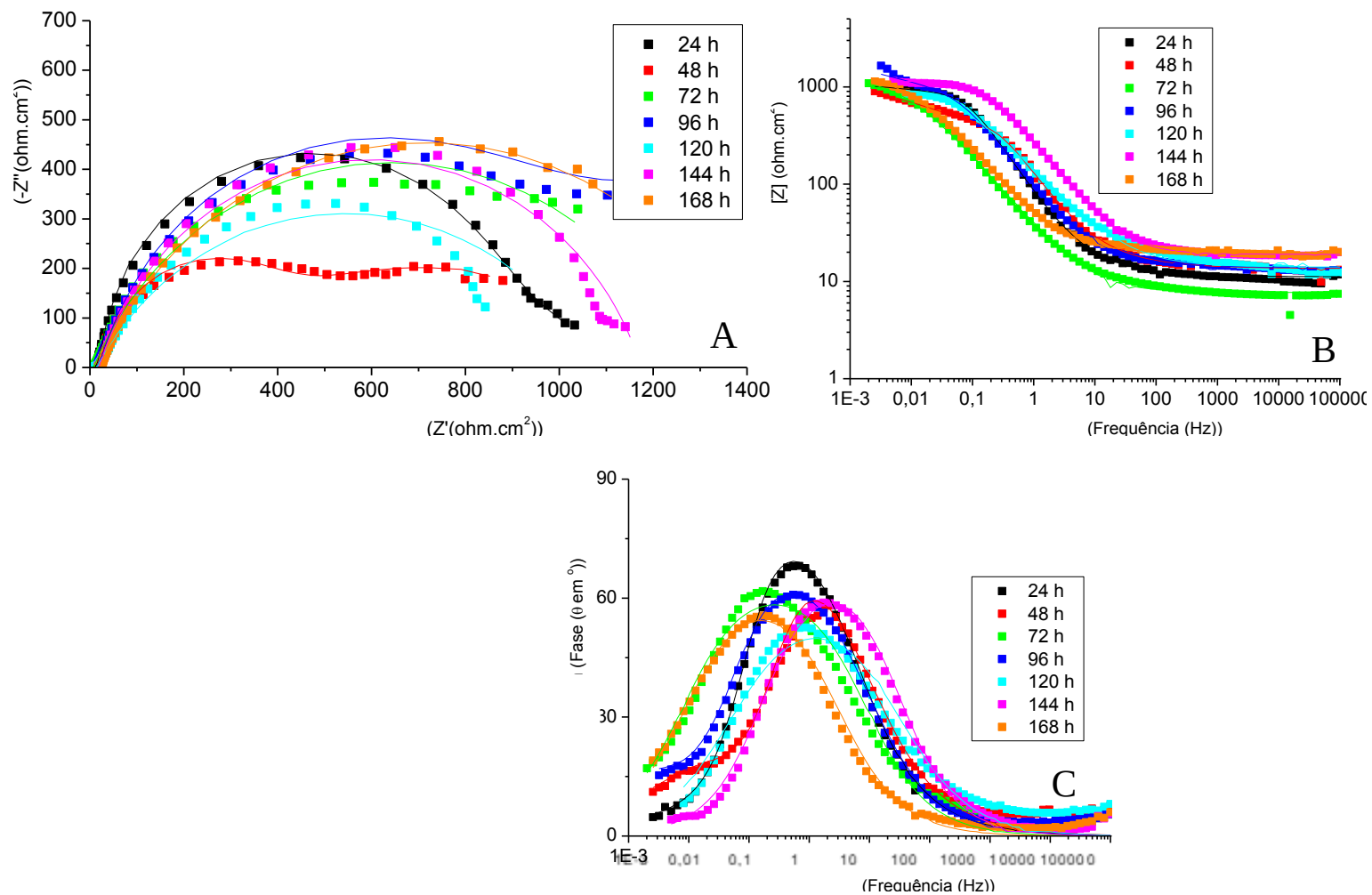
Fonte: O autor, 2017

Figura 21 -Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bode (B) Diagrama de Fases (C) para os ensaios com lúpulo



Fonte: O autor, 2017

Figura 22 - Diagrama de Nyquist (A), Diagrama de Bode (B) Diagrama de Fases (C) para os ensaios com extrato de nim



Fonte: O autor, 2017

A partir das medições realizadas, diversos resultados podem ser observados. É interessante notar que, para os ensaios na ausência de biocidas, conforme a Figura 19A, o arco capacitivo teve uma tendência de aumento com o passar do tempo. Tal aumento gera uma maior resistência ao processo corrosivo e pode estar associado ao aumento da quantidade de bactérias sésseis aderidas ao substrato.

No diagrama de Fase (Figura 19C), observa-se dois movimentos: deslocamento do máximo do ângulo de fase para valores maiores de frequência até 48 horas e, posteriormente, deslocamento do máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência. O primeiro movimento está associado à presença de um filme protetor e o segundo está associado a formação de um filme condutor.

Logo, a partir destes resultados, pode-se acreditar que a adesão de células sésseis na superfície do CP auxilia na proteção contra a corrosão nos primeiros dias e, posteriormente, favorece o processo corrosivo.

No caso dos ensaios na presença do glutaraldeído, àquele que não teve crescimento de bactérias sésseis de acordo com o ensaio de quantificação microbiana, os resultados apontaram crescimento da resistência à transferência de carga até às 120 horas de exposição e, em seguida, verificou-se diminuição deste parâmetro. Tal efeito pode ser visualizado na figura 20.A.

Pode-se perceber, visualmente, por meio da Figura 20A a presença de corrosão por pite no ensaio com glutaraldeído para o tempo de 168 horas (ANNERGREN et al. 1997).

No diagrama de Fase (Figura 20C), observa-se o movimento de deslocamento do máximo do ângulo de fase para valores maiores de frequência quando comparados todos os ensaios com àquele resultado obtido para as 24 horas. Mesmo assim, os resultados indicaram, novamente, dois movimentos: deslocamento do máximo do ângulo de fase para valores maiores de frequência até 48 horas e, posteriormente, deslocamento do máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência. O primeiro movimento está associado à presença de um filme protetor e o segundo está associado a formação de um filme condutor que favorece o processo corrosivo (GUNASEKARAN et al., 2004).

Este efeito protetor também foi encontrado na literatura associado ao aumento de bactérias aderidas aos CPs. Com o aumento da espessura do biofilme resultante do crescimento microbiano, passam a existir duas regiões: uma camada ativa interior

formada por bactérias e uma camada externa solta com permeabilidade possibilitando que as bactérias se reproduzam e metabolizem os substratos (LIU et al., 2009).

No caso dos ensaios na presença do lúpulo, os resultados apontaram crescimento da resistência à transferência de carga até às 24 horas de exposição e, em seguida, verificou-se diminuição deste parâmetro. Tal efeito pode ser visualizado na figura 21.A.

A figura 21.A demonstra resultados interessantes como, por exemplo, o crescimento inicial de bactérias sésseis acelerado pela adição de fontes adicionais de carbono provocando um aumento da resistência a transferência de carga. Segundo Ramasamy et al. (2008), esta resistência inicial alta é normal e precedida de resistências menores com o aumento do tempo de exposição ao meio biótico.

No diagrama de Fase (Figura 20C), observa-se o movimento de deslocamento do máximo do ângulo de fase para valores maiores de frequência quando comparados todos os ensaios com àquele resultado obtido para as 24 horas. Mesmo assim, os resultados indicaram, novamente, dois movimentos: deslocamento do máximo do ângulo de fase para valores maiores de frequência até 48 horas e, posteriormente, deslocamento do máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência. O primeiro movimento está associado à presença de um filme protetor e o segundo está associado a formação de um filme condutor.

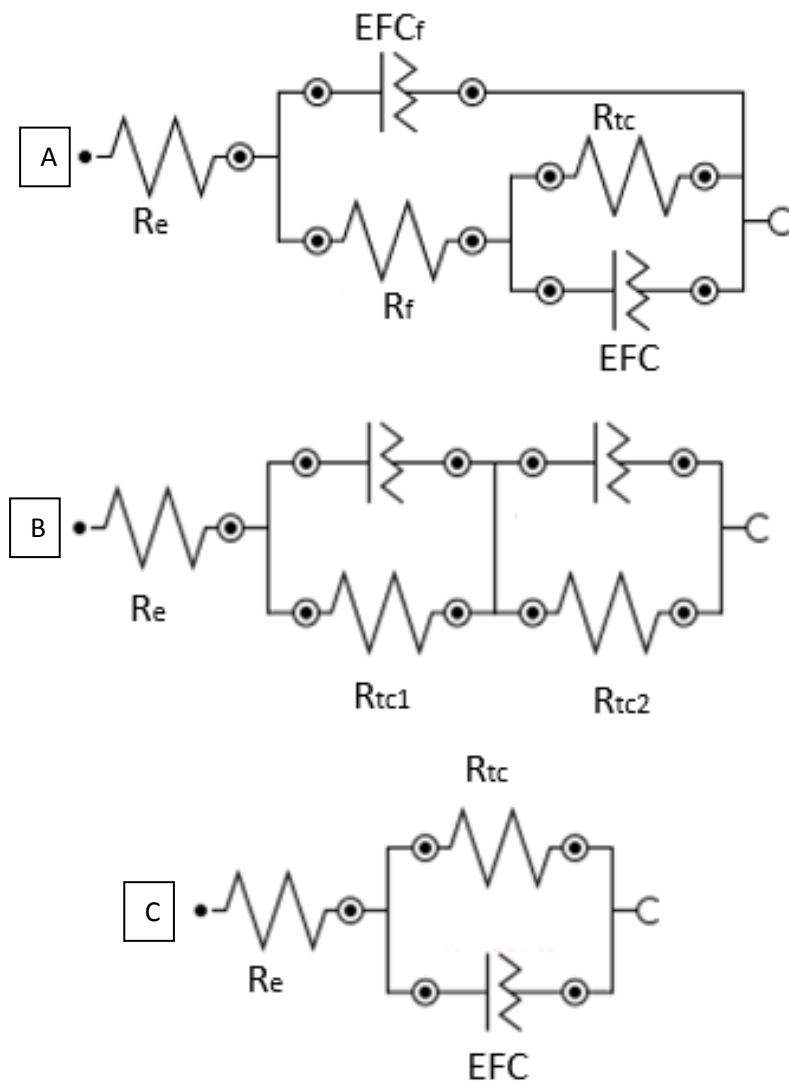
No caso dos ensaios na presença do extrato de nim, os resultados apontaram diminuição da resistência à transferência de carga até às 48 horas de exposição e, em seguida, verificou-se um aumento do arco capacitivo. Tal efeito pode ser visualizado na figura 22.A.

No diagrama de Fase (Figura 22C), não se observa uma tendência do movimento de deslocamento do máximo do ângulo de fase. Ao fim do ensaio, tem-se um deslocamento do máximo do ângulo de fase para maiores valores de frequência sugerindo a formação de um filme protetor.

Vale lembrar que, conforme citado na seção 2.7, os resultados obtidos foram simulados em circuitos elétricos equivalentes e a capacitância da dupla camada elétrica foi calculada de acordo com a equação 2.

Foram utilizados circuitos distintos para simular os sistemas, conforme pode ser visualizado na figura 23.

Figura 23: Circuitos elétricos equivalentes utilizados nas simulações

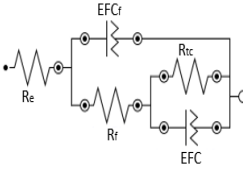
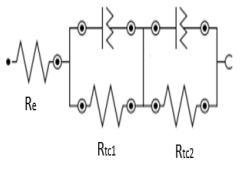
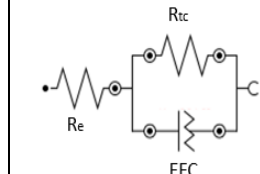


Fonte: O autor, 2017

É interessante notar que o circuito elétrico equivalente utilizado no extrato de ním para 48 horas possui dois sistemas formados por um elemento de fase constante e uma resistência. Uma delas diz respeito ao controle do processo corrosivo e a outra pode estar associada aos fenômenos físicos de adsorção ou transporte de massa (MCCAFFERTY, 2009). Vale lembrar que o ajuste da simulação foi considerado bom para um valor de erro menor que 1% (BAYOUDH et al., 2008).

A tabela 12 indica os circuitos elétricos equivalentes utilizados para simular os dados obtidos nos diagramas de Bodè e de Fases.

Tabela 12: Circuitos elétricos equivalentes utilizados para simular os sistemas controle, glutaraldeído, extrato de nim e lúpulo

Condições		Circuito Elétrico Equivalente Utilizado		
				
Controle	24 h			X
	48 h			X
	72 h			X
	96 h		X	
	120 h		X	
	144 h			X
	168 h		X	
Glutaraldeído	24 h		X	
	48 h			X
	72 h	X		
	96 h			X
	120 h			X
	144 h			X
	168 h			X
Extrato de Nim	24 h		X	
	48 h		X	
	72 h			X
	96 h		X	
	120 h			X
	144 h			X
	168 h			X
Lúpulo	24 h			X
	48 h			X
	72 h			X
	96 h			X
	120 h			X
	144 h			X
	168 h			X

Já a tabela 13 indica os resultados das simulações dos circuitos elétricos equivalentes utilizados nos sistemas controle, glutaraldeído, lúpulo e extrato de nim.

Tabela 13: Resultados de simulação dos Circuitos Elétricos Equivalentes (Continua)

Tempo	Parâmetro	Controle	Glutaraldeído	Lúpulo	Extrato de Nim
24 horas	$R_e(\Omega)$	5,35	10,4	3,92	3,18
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	723,905	684,342	2776,41	1112,67
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	2,26E-2	3,61E-2	2,60E-3	8,86E-3
	N	0,77	0,728	0,913	1,00
48 horas	$R_e(\Omega)$	4,69	2,66	3,39	4,64
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	831,04	665,55	939,75	1140,75
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	9,16E-3	1,05E-3	4,63E-3	7,80E-2
	N	0,725	0,794	0,7	0,715
72 horas	$R_e(\Omega)$	5,57	4,33	1,88	2,02
	$R_f(\Omega \text{ cm}^2)$		484,88		
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	791,35	333,355	1112,22	1269,2
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	1,90E-2	2,08E-2	9,19E-2	9,46E-2
	$C_{dcef}(\mu\text{F cm}^{-2})$		1,05E-3		
	N	0,884	0,729	0,732	0,735
	N_f		0,799		
96 horas	$R_e(\Omega)$	3,19	8,14	2,66	4,12
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	1057,875	994,41	678,395	2821,31
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	3,23E-3	2,59E-3	4,60E-3	1,87E-2
	N	0,972	0,833	0,836	0,767
120 horas	$R_e(\Omega)$	4,01	7,84	3,67	4,00
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	1216,8	1146,08	769,3	1063,53
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	6,41E-2	4,11E-3	1,41E-2	1,55E-2
	N	0,711	0,75	0,725	0,723

Fonte: O autor, 2017

Tabela 13: Resultados de simulação dos Circuitos Elétricos Equivalentes (Conclusão)

Tempo	Parâmetro	Controle	Glutaraldeído	Lúpulo	Extrato de Nim
144 horas	$R_e(\Omega)$	4,33	4,19	2,77	5,7
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	1365	605,52	1109,22	1155,51
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	1,74E-2	3,88E-3	8,32E-4	3,42E-3
	N	0,745	0,723	0,822	0,8
168 horas	$R_e(\Omega)$	7,00	5,99	4,09	7,31
	$R_{tc}(\Omega \text{ cm}^2)$	1138,48	652,935	771,4	1395,9
	$C_{dce}(\mu\text{F cm}^{-2})$	4,87 E-3	3,44E-3	3,79E-3	4,99E-2
	N	0,879	0,872	0,757	0,735

Fonte: O autor, 2017

Os resultados das simulações para 24 horas, conforme a Tabela 12, confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso em meio contendo lúpulo apresentou o maior valor de R_{tc} e o menor valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições realmente tem menor condutividade.

Já para 48 horas, os resultados das simulações confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso em meio contendo glutaraldeído apresentou o menor valor de R_{tc} e o menor valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições realmente tem menor condutividade sugerindo a presença de um filme protetor.

No caso das simulações para 72 horas, os resultados das simulações confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso em meio contendo extrato de nim apresentou o maior valor de R_{tc} e o maior valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições tem características de um filme condutor.

Já para 96 horas de exposição, os resultados das simulações confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso em meio contendo extrato de nim apresentou o maior valor de R_{tc} e o maior valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições realmente tem maior condutividade. É interessante notar que, embora o valor de R_{tc} para o CP imerso no meio com glutaraldeído seja menor do que para aquele exposto ao meio sem biocida,

um menor valor de C_{dce} foi obtido, indicando que a superfície desse CP estava recoberta com um filme menos condutor.

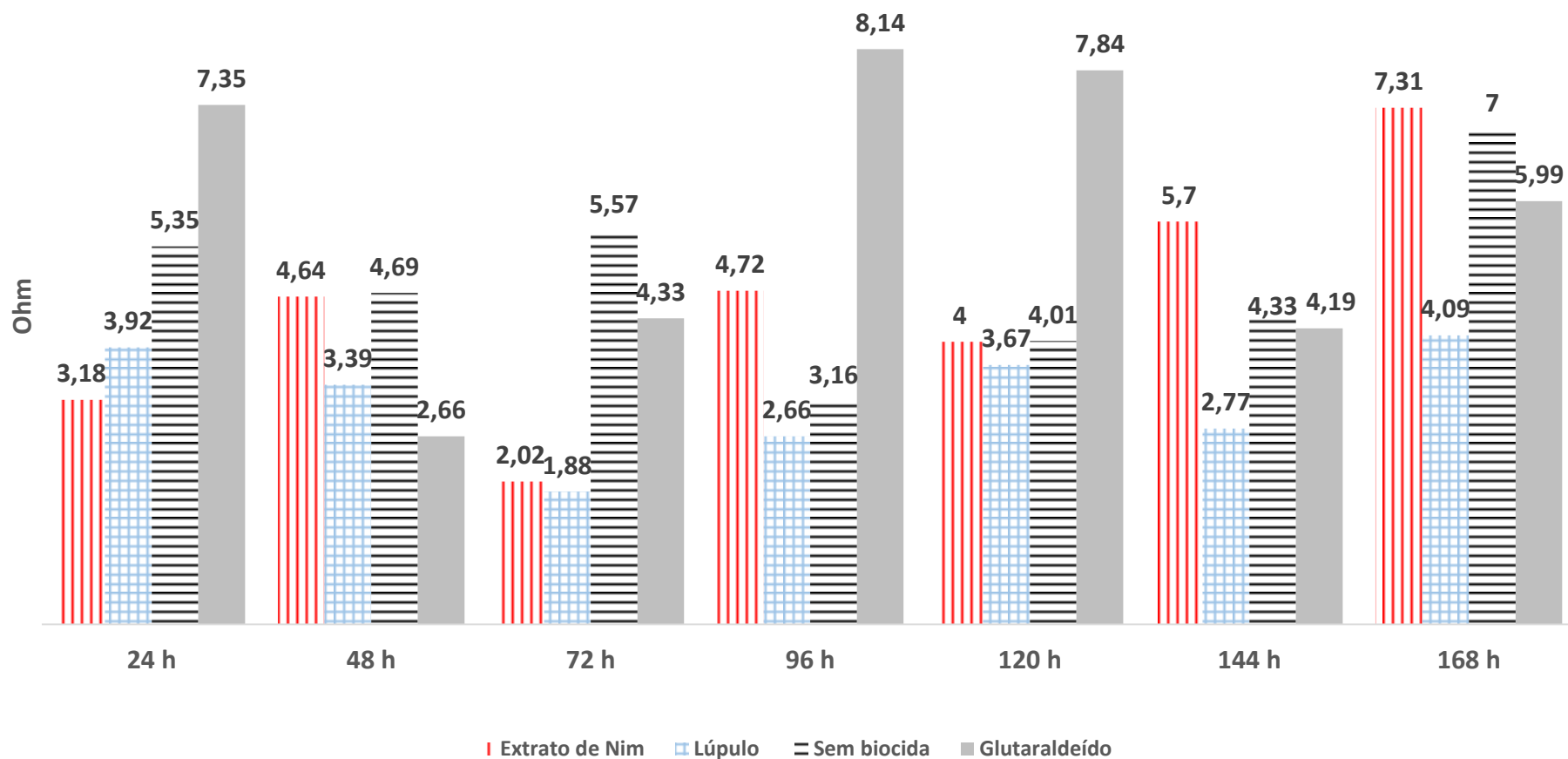
Para 120 horas de exposição, os resultados das simulações confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso no meio na ausência de biocidas apresenta o maior valor de R_{tc} e o maior valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições realmente tem maior condutividade. É interessante notar que, embora o valor de R_{tc} para o CP imerso no meio com glutaraldeído seja um pouco menor do que para aquele exposto ao meio sem biocida, um menor valor de C_{dce} foi obtido, indicando que a superfície desse CP estava recoberta com um filme menos condutor.

Os resultados da simulação para 144 horas de exposição mostram que, conforme verificado nos diagramas de Nyquist, os CPs expostos aos meios com os biocidas lúpulo e extrato de nim apresentaram maiores valores de R_{tc} , sugerindo um aumento de proteção. Contudo, houve um aumento significativo nos valores de C_{dce} , indicando que os biofilmes formados nesses CPs têm características mais condutoras. Como houve decréscimo da quantidade de bactérias sésseis aderidas aos CPs nesses ensaios, é provável que os filmes formados apresentem porosidades (BARCIA et al. 2002), favorecendo o ataque do eletrólito à superfície e, conseqüentemente, o processo corrosivo.

No caso das simulações para 68 horas, os resultados das simulações confirmam as observações feitas com base nos diagramas de Nyquist e de fase: o CP imerso em meio contendo extrato de nim apresentou o maior valor de R_{tc} e o maior valor de C_{dce} . Assim, verifica-se que o biofilme formado nessas condições tem características de um biofilme condutor.

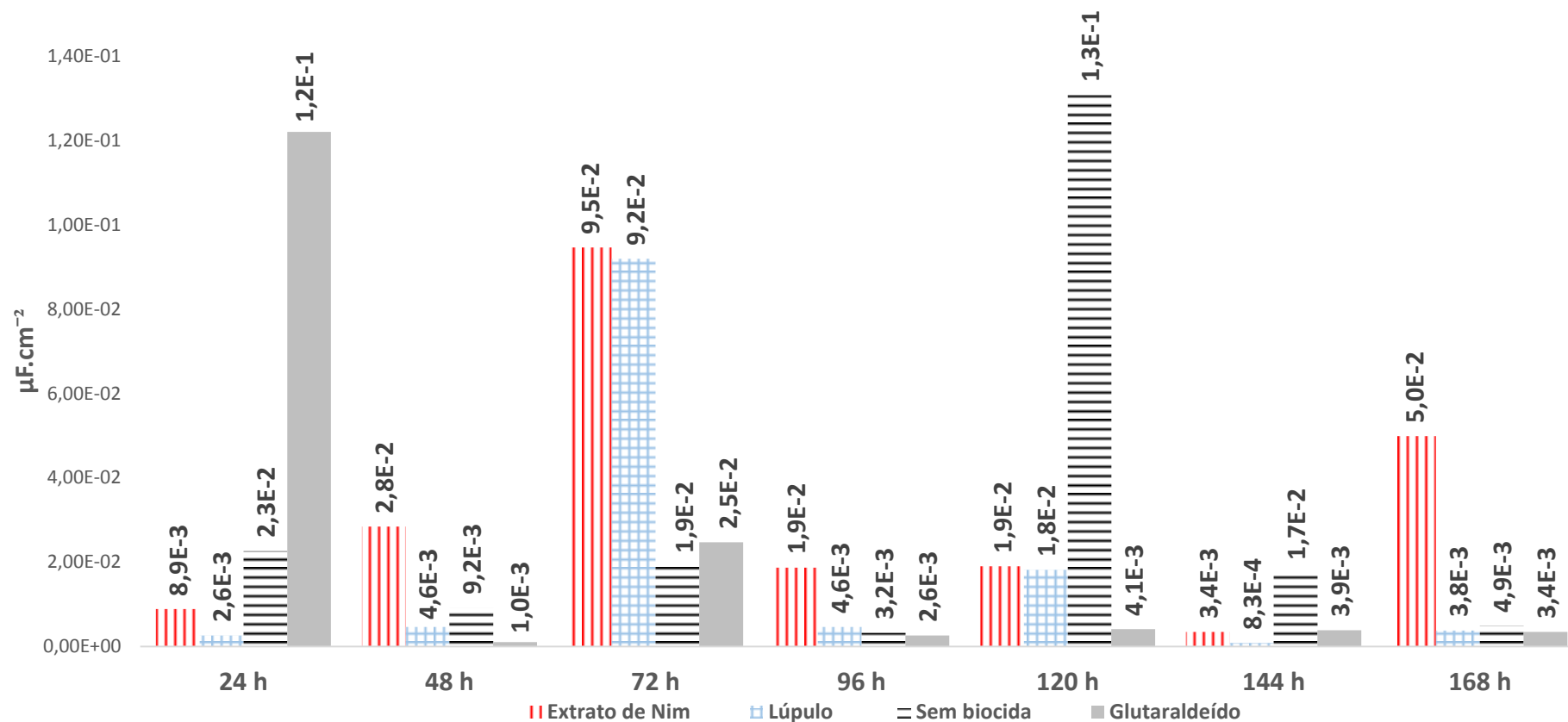
As figuras 24, 25 e 26 mostram a evolução dos parâmetros resistência do eletrólito (R_e), resistência à transferência de carga (R_{tc}) e a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}).

Figura 24–Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) em todas as condições



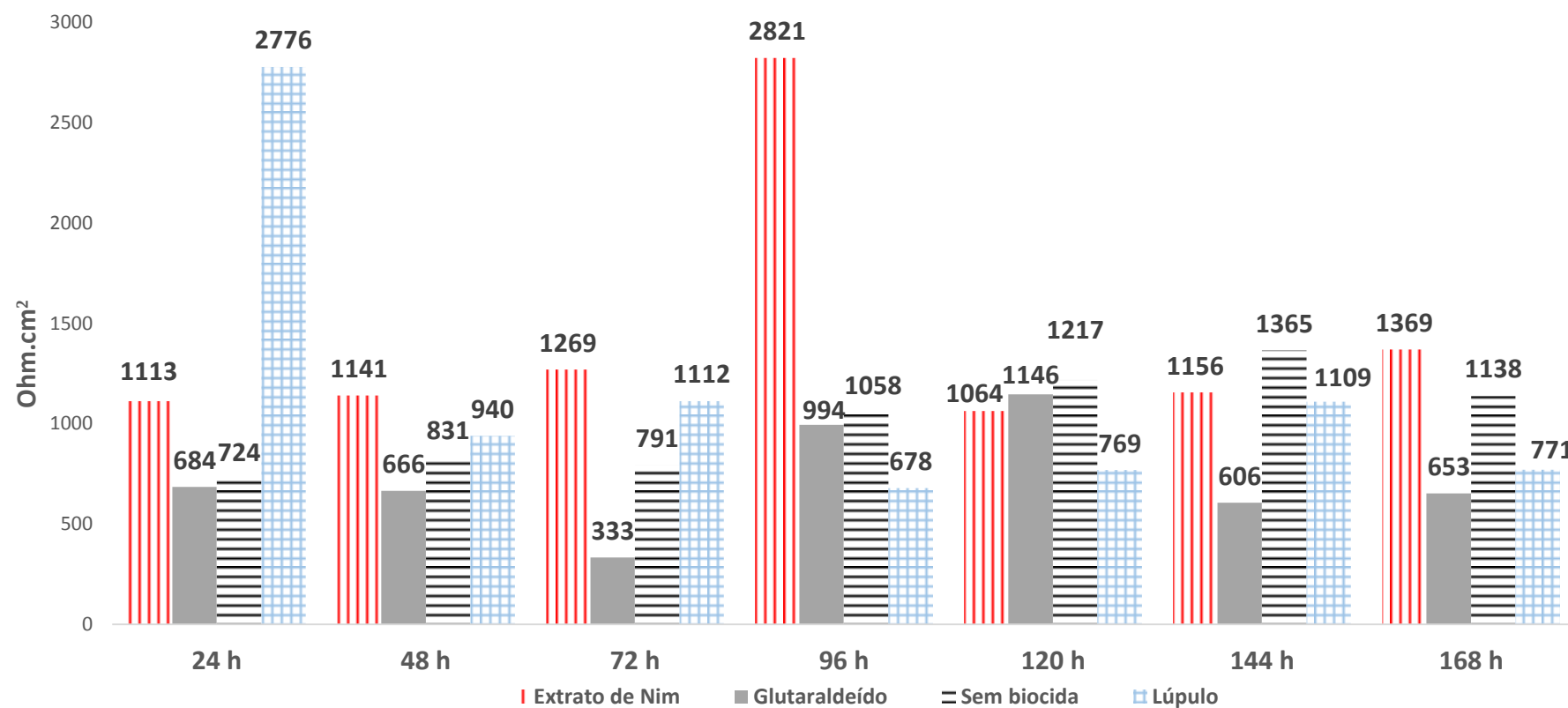
Fonte: O autor, 2017

Figura 25—Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) em todas as condições



Fonte: O autor, 2017

Figura 26—Evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência à transferência de carga (R_{tc}) em todas as condições



Fonte: O autor, 2017

A figura 24 mostra a evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) em todas as condições.

De uma forma geral, os meios contendo glutaraldeído possuem os maiores valores do parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) quando comparado com os outros ensaios. Este aumento está associado a maior resistência do meio provocado pelo glutaraldeído reflexo da baixa concentração de produtos de corrosão e substâncias poliméricas extracelulares (SPE).

Os ensaios com lúpulo tiveram o menor valor do parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) quando comparado com os outros ensaios. Esse menor valor sugere uma maior condutividade dos meios contendo lúpulo pela maior presença de íons no meio.

Já os ensaios com extrato de nim apresentaram um aumento gradativo do parâmetro de resistência ao eletrólito (R_e) ao longo do tempo de exposição. Esse aumento sugere uma maior condutividade do meio com o passar do tempo e uma menor presença de produtos de corrosão com o passar do tempo de exposição.

A figura 25 mostra a evolução dos resultados simulados para o parâmetro de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) em todas as condições. O resultado mostra uma tendência do ensaio com glutaraldeído se permanecer relativamente constante sugerindo a formação de filmes menos condutores do que os outros ensaios, com exceção do primeiro dia.

O ensaio com lúpulo também apresentou valores baixos de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}), salvo o caso dos ensaios com três e cinco dias de exposição, cujo comportamento se aproximou ao do extrato de nim. Esse acréscimo pode ser a consequência dos produtos de corrosão mais condutores que aqueles formados no ensaio com glutaraldeído e de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) presentes nestes meios.

Vale lembrar que o ensaio contendo o biocida extrato de nim teve os maiores valores de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) quando comparado com o lúpulo reforçando a idéia de produtos de corrosão diferentes.

O ensaio na ausência de biocidas possui valores de capacitância da dupla camada elétrica (C_{dce}) menores que aqueles com biocidas, dependendo do tempo de

exposição. Os aumentos possuem relação direta com o crescimento microbiano presente nestes ensaios uma vez que são favorecidos pela cinética das reações eletroquímicas (RAMASAMY et al., 2008).

No caso dos ensaios com 5 e 7 dias de exposição ao meio biótico, percebe-se, respectivamente, um aumento e um decréscimo dos valores obtidos. O aumento sugere a formação de produtos de corrosão com alta capacidade condutiva, para estes ensaios.

Já o decréscimo pode ser consequência de uma diminuição das taxas de crescimento microbiano associado a uma espessura maior do filme. Uma maior espessura do biofilme protege o CP uma vez que previne o contato do meio com a superfície (LIU et al., 2009).

A figura 26 mostra a evolução dos resultados simulados para o parâmetro de resistência à transferência de carga (R_{tc}) em todas as condições. A figura demonstra resultados interessantes como por exemplo, o lúpulo que, inicialmente, possui o crescimento inicial de bactérias sésseis acelerado pela adição de fontes adicionais de carbono provocando um aumento da resistência a transferência de carga. Segundo Ramasamy et al. (2008), esta resistência inicial alta é normal e precedida de resistências menores com o aumento do tempo de exposição ao meio biótico.

Já o ensaio na ausência de biocidas apresentou aumentos ao longo dos dias de exposição, com exceção do dia 7. Esse efeito pode estar associado ao aumento da espessura do biofilme conferindo certa proteção ao substrato e, ao final de 7 dias, o crescimento das bactérias sésseis diminui começando a expor o CP ao processo corrosivo.

No caso do extrato de nim, pode-se concluir que ele não adicionou tanto substrato quanto o lúpulo. Além disso, a adição do extrato de nim e os produtos de corrosão inicialmente gerados inibem o crescimento de bactérias e aumentaram a resistência à transferência de carga.

Quanto aos ensaios contendo glutaraldeído, percebe-se ele possui um valor de resistência à transferência de carga menor que os ensaios na ausência de biocidas e contendo extrato de nim em quase todos os casos. Esta menor resistência pode estar associada ao fato de não existir a presença de um biofilme deixando a superfície descoberta favorecendo o processo corrosivo.

3.3 – Ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

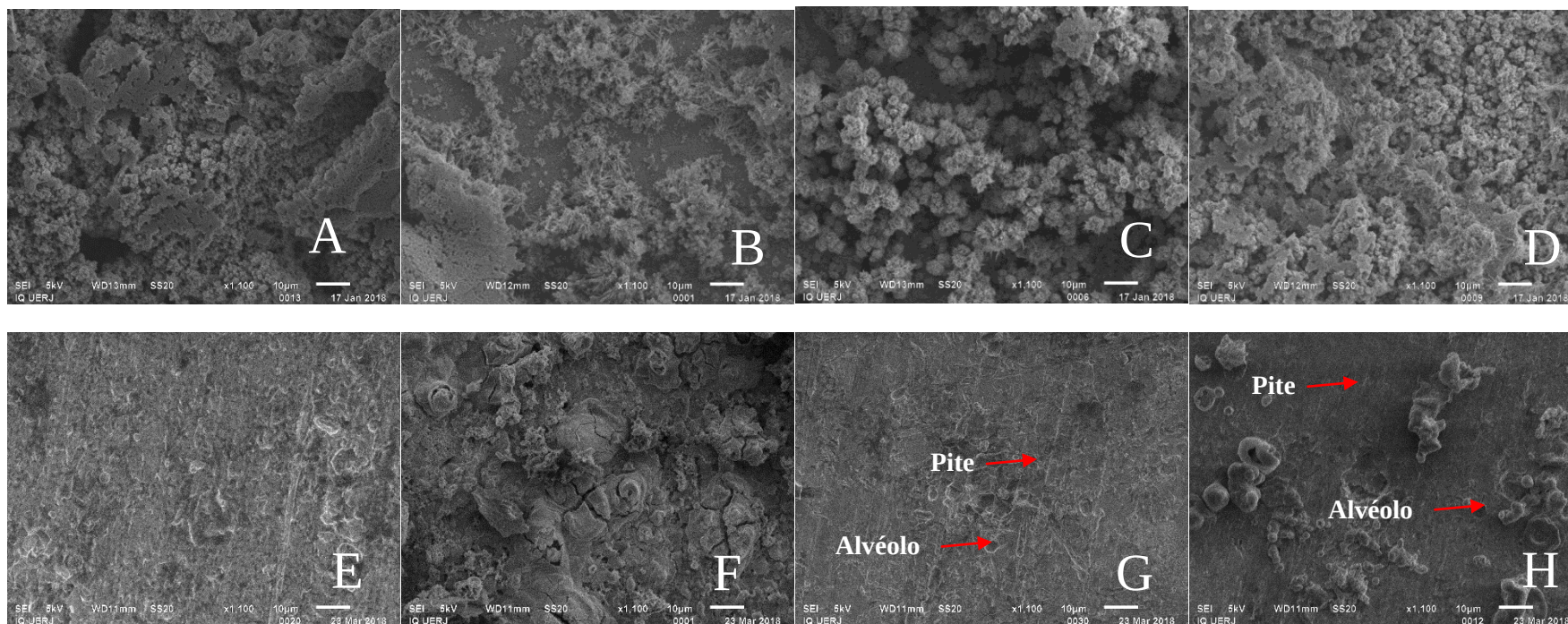
Esses ensaios foram realizados para os CP incubados por 4 e 7 dias nos meios contendo a cultura de *Desulfovibrio alaskensis* sem biocidas, como biocidas glutaraldeído, extrato de nim e lúpulo antes e após a remoção dos biofilmes. As Figuras 27 e 28 apresentam as micrografias da superfície desses CP com aumento de 1100 vezes para os ensaios com duração de 4 e 7 dias, respectivamente. É possível verificar nas micrografias que a presença de diferentes biocidas nos meios de incubação originou morfologias superficiais bastante distintas, que podem corroborar as variações de resultados encontrados nos ensaios de EIE.

O CP imerso ao meio na ausência de biocidas por 4 dias (Figura 27A) apresenta um filme heterogêneo na superfície. Tal cenário se manteve inalterado quando se compara os resultados obtidos para 4 e 7 dias de exposição (Figura 28A). Esse resultado é oriundo do aumento da população de bactérias sésseis sendo confirmado, sobretudo, no resultado de quantificação microbiana obtido anteriormente nesta dissertação após sete dias que corresponde a $6,8 \times 10^6$ células/cm².

Após a remoção do biofilme com 4 dias de exposição (Figura 27E), verificou-se a ocorrência de corrosão generalizada e corrosão alveolar na superfície do CP. A corrosão localizada do tipo alveolar está associada a formação de pequenos sulcos arredondados na superfície do CP. A remoção do biofilme com 7 dias de exposição (Figura 28G) mostrou que ocorreu uma intensificação do processo corrosivo, tendo sido observada corrosão por pites, além da corrosão generalizada e alveolar na superfície do CP.

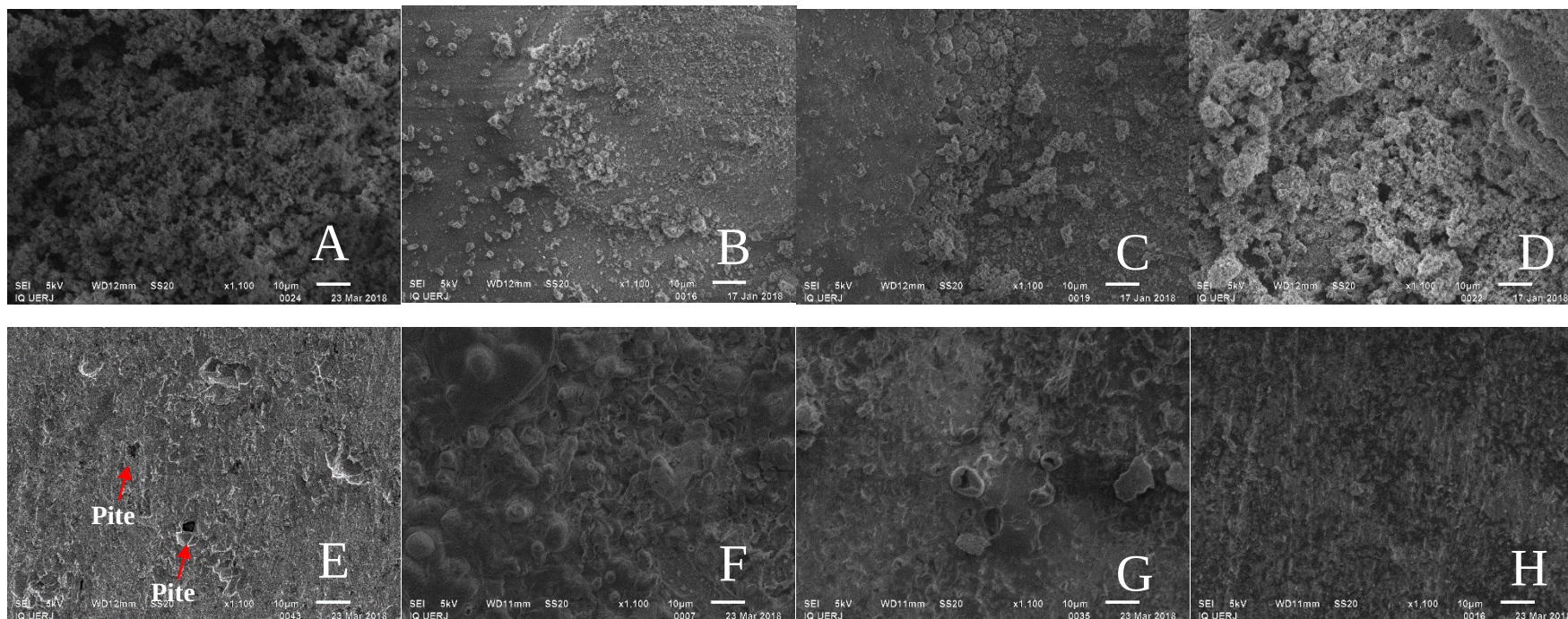
Nota-se no CP imerso no meio contendo o biocida glutaraldeído por 4 dias (Figura 27.B), a presença de um filme imperfeito, com poucos aglomerados de massa celular. Após a retirada do filme (Figura 27.F), encontra-se, ainda, a presença de um filme dificultando qualquer conclusão. Logo, o procedimento a ser adotado para a decapagem nestas condições deve ser alterado.

Figura 27: Microscopia da superfície do aço carbono 1020 para os seguintes ensaios: na ausência de biocidas após 04 dias (A) e após a retirada do biofilme (E), com o biocida glutaraldeído após 04 dias (B) e após a retirada do biofilme (F), com o biocida extrato de nim após 04 dias (C) e após a retirada do filme (G), com o biocida lúpulo após 04 dias (D) e após a retirada do biofilme (H).



Fonte: 2018, O autor

Figura 28: Microscopia da superfície do aço carbono 1020 para os seguintes ensaios: na ausência de biocidas após 07 dias (A) e após a retirada do biofilme (E), com o biocida glutaraldeído após 07 dias (B) e após a retirada do biofilme (F), com o biocida extrato de nim após 07 dias (C) e após a retirada do biofilme (G), com o biocida lúpulo após 07 dias (D) e após a retirada do biofilme (H).



Fonte: 2018, O autor

Após 7 dias de incubação (Figuras 28.B) visualizou-se uma sensível diminuição dos aglomerados observados com 4 dias. Este resultado corrobora a avaliação do crescimento microbiano (Figura 17), uma vez que não foi identificada a presença de BRS nesse material. No entanto, a presença de alguns aglomerados de células explica o valor mais positivo de OCP (Figura 18), em comparação com o meio sem biocida. Outro aspecto relevante observado nesse caso é a dispersão das massas celulares nos CP, o que sugere uma modificação da estrutura final do biofilme/produto de corrosão obtido. O resultado encontrado para o CP imerso no meio com glutaraldeído na presente dissertação é similar àqueles obtidos por Silva (2015) e Lavania et al.(2011). Após a decapagem do CP (Figuras 28.F), encontra-se, ainda, a presença de um filme dificultando qualquer conclusão. Logo, o procedimento a ser adotado para a decapagem nestas condições deve ser alterado.

Já oCP imerso ao meio contendo o extrato de nim por 4 dias (Figura 27C) apresenta um biofilme volumoso e poroso, tornando possível que o substrato esteja exposto ao meio corrosivo. Esse resultado pode explicar os resultados de EIE encontrados nessas condições do estudo. A quantidade de bactérias sésseis, parâmetro avaliado nos ensaios de quantificação microbiana, possui correlação direta na corrosão microbiologicamente induzida (KING e MILLER, 1971). Verifica-se também uma diminuição de aglomerados na superfície do CP quando se comparam os as micrografias de quatro (Figura 27C) e sete dias (Figura 28B) de exposição ao meio contendo extrato de nim.

Após a remoção do filme com 4 dias de exposição (Figura 27G), verificou-se a ocorrência de corrosão uniforme e corrosão alveolar na superfície do CP. A corrosão localizada do tipo alveolar está associada a formação de pequenos sulcos arredondados na superfície do CP. Após a remoção do filme com 7 dias de exposição (Figura 28G), verificou-se a ocorrência de corrosão generalizada, corrosão por pites e corrosão alveolar na superfície do CP.

Já oCP exposto ao meio contendo o lúpulo por 4 dias (Figura 27D) mostrou um biofilme volumoso e mais compacto do que aquele obtido para o meio com extrato de nim (Figura 27C). Isso explicaria os maiores valores de R_{tc} e menores valores de C_{dce} encontrados em muitas das condições estudadas. Assim como o CP incubado na presença do extrato de nim, observa-se uma diminuição de massa celular com o passar

do tempo quando se compara as Figuras 27D e 28D, mas em menor quantidade que àquela diminuição obtida no ensaio com extrato de nim. Este resultado já era esperado, pois sabe-se que o lúpulo funciona melhor na inibição do crescimento de bactérias gram-positiva (LAGEZAAL et al., 1992). Após a remoção do filme com 4 dias de exposição (Figura 27G), verificou-se a ocorrência de corrosão uniforme e corrosão por pite na superfície do CP. Já no caso da remoção do biofilme com 7 dias de exposição (Figura 28H), verificou-se a ocorrência de corrosão uniforme por toda extensão do CP.

3.4 – Resumo dos Resultados obtidos

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos de forma resumida para todos os ensaios.

Tabela 14: Resultados resumidos para os ensaios de quantificação microbiana e os ensaios eletroquímicos

Biocida	Quantificação microbiana	OCP	EIE
Sem biocida	Crescimento das BRS ao longo do período de incubação.	Deslocamento do OCP para valores mais positivos, ao final de 7 dias, porém apenas a partir do quarto dia de exposição.	O arco capacitivo teve uma tendência de aumento com o passar do tempo, o que pode estar associado ao aumento da quantidade de bactérias sésseis aderidas ao substrato.
Lúpulo	Crescimento das BRS sésseis até o segundo dia, superando o ensaio sem biocidas e posterior redução da população de bactérias sésseis.	Deslocamento do OCP para valores mais negativos em relação ao ensaio realizado na ausência de biocida.	Resultados apontaram um aumento na resistência à transferência de carga até às 24 horas de exposição, com posterior decréscimo variável com o tempo.
Glutaraldeído	Não houve crescimento de BRS sésseis na superfície do CP.	Deslocamento para valores mais positivos que o CP imerso no meio sem biocida, para todos os tempos.	Resultados apontaram aumento da resistência à transferência de carga até 120 horas de exposição e, posterior decréscimo da variável. Visualmente, tem-se a suspeita de corrosão por pite no ensaio com 168 horas.
Extrato de Nim	Crescimento das BRS sésseis até o segundo dia, superando o ensaio na ausência de biocidas, havendo posterior redução da população de BRS.	Deslocamento do OCP para valores mais positivos a partir do terceiro dia, quando comparados com os ensaios sem biocidas.	Resultados apontaram diminuição da resistência à transferência de carga até 48 horas de exposição, havendo posterior aumento do arco capacitivo.

Fonte: O autor, 2017

Baseado na tabela 14 pode-se concluir que os potenciais biocidas utilizados foram filmes cujo principal mecanismo de atuação é a formação de uma espécie de barreira evitando, assim, o contato da superfície do CP com as bactérias. Tal filme formado não evitou o crescimento inicial das BRS, mas inibiu o ataque das BRS na superfície da superfície metálica ao longo do tempo. Além disso, mesmo com a presença do filme nos ensaios, ainda se verificou a formação de pites.

CONCLUSÕES

- Todos os ensaios tiveram como resultado o deslocamento do OCP para valores mais positivos, ao final de 7 dias, fenômeno esse conhecido como “enobrecimento”. Ele está associado à reprodução e colonização das BRS na superfície do corpo de prova corroborando os resultados de quantificação microbiana, exceto para os ensaios com o biocida glutaraldeído;
- A adição do lúpulo minimizou a ocorrência do fenômeno de “enobrecimento” na superfície do CP, sugerindo uma adsorção prévia dos compostos do lúpulo dificultando a adesão microbiana, principalmente nas primeiras 24 horas. Os resultados apontaram crescimento da resistência à transferência de carga neste início e, em seguida, verificou-se diminuição deste parâmetro;
- Os ensaios na ausência de biocidas apresentaram aumento nos valores de resistência à transferência de carga (R_{tc}) ao longo dos dias de exposição. Esse efeito pode estar associado ao aumento da espessura do biofilme. Além disso, o CP apresentou a formação de um filme heterogêneo na superfície verificando-se a ocorrência de corrosão uniforme e corrosão alveolar na sua superfície;
- No caso dos ensaios contendo glutaraldeído, observou-se um valor de resistência à transferência de carga menor do que naqueles na ausência de biocidas e contendo extrato de nim, em quase todos os tempos de exposição. Esta menor resistência pode estar associada ao fato de não existir tanto a presença de um biofilme na superfície do CP, hipótese confirmada no MEV, quanto bactérias aderidas ao CP ratificada na quantificação microbiana. A junção desses fatores favorece o processo corrosivo.
- Nota-se no CP imerso nos meios contendo tanto o biocida glutaraldeído quanto o extrato de nim, a ocorrência de corrosão uniforme e por pite;

Logo, a avaliação da CMI permitiu concluir que:

- O lúpulo foi o biocida que propiciou a formação de biofilmes menos condutores em comparação com o extrato de nim. Além disso, a adição de lúpulo ao meio manteve o OCP relativamente inalterado minimizando o ‘enobrecimento’ do CP. Isto sugere uma adsorção prévia dos compostos do lúpulo, dificultando a formação do biofilme e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de bactérias sésseis ao longo do tempo. Adicionalmente, verificou-se uma maior

resistência à transferência de carga (R_{tc}), na fase de crescimento exponencial das bactérias;

- Os resultados mostram que o lúpulo atuou de forma mais efetiva até as primeiras 48 horas e, posteriormente, o extrato de nim foi o biocida mais eficiente quando se analisa o parâmetro de resistência à transferência de carga (R_{tc});
- Os resultados mostraram uma inibição de 72% do crescimento de bactérias sésseis nos meios contendo lúpulo e extrato de nim, ao final de sete dias. Baseado nesses resultados, pode-se sugerir a adição inicial de biocidas naturais, com a finalidade de formar biofilmes na superfície e, posteriormente, adicionar o glutaraldeído numa concentração inferior à estudada na presente dissertação para inibir o crescimento bacteriano;
- Pode-se concluir, portanto, que nenhum biocida natural estudado possui a eficiência do biocida comercial glutaraldeído. Eles podem, no máximo, diminuir a quantidade de glutaraldeído utilizado na natureza. O mecanismo de inibição do crescimento nas condições com os biocidas naturais assemelha-se ao de uma barreira física impedindo a interação entre a superfície do CP com as bactérias. A utilização de novos compostos naturais com estrutura química semelhante ao glutaraldeído pode ser uma proposta interessante para dar continuidade aos estudos inibitórios.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar uma forma de realizar adições de biocidas em tempos intermediários e estudar esse efeito;
- Avaliar diferentes concentrações de biocidas lúpulo e extrato de nimcom a finalidade de definir uma concentração ótima;
- Caracterizar os produtos de corrosão presentes na superfície do CP;
- Avaliar o uso de biocidas naturais em conjunto com o glutaraldeído, com a finalidade de diminuir a concentração deste biocida nos meios onde corrosão por BRS ocorre.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. A.; FARGHALI, A. R.; FEKRY, A. M. Study for the Stability and Corrosion Inhibition of Electrophoretic Deposited Chitosan on Mild Steel Alloy in Acidic Medium. **International Journal of Electrochemical Science**, 7, Agosto 2012. 7270-7282.
- 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**, 22, n. 11, Novembro 2013. 3517-3529.
- ANDRADE, M. M. **Análise da cinética de formação de biofilmes em junta soldada longitudinal de aço API 5L X80 em sistema dinâmico**. Rio de Janeiro: Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos Químicos e Metalúrgicos) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2013. 138 p.
- ANNERGREN, I.; THIERRY, D.; ZOU, F. Localized Electrochemical Impedance Spectroscopy for Studying Pitting Corrosion on Stainless Steels. **Journal of The Electrochemical Society**, 144, 4 Abril 1997. 1208-1214.
- ASTM. Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens - G1. In: **ASTM Annual Book of ASTM Standards**. Pensilvânia: [s.n.], 2002.
- BARCIA, O. E. et al. Application of the impedance model of de Levie for the characterization of porous electrodes. **Electrochimica Acta**, Oxford, 47, 2002. 2109-2116.
- BATMANGHELICH, F.; LI, L.; SEO, Y. Influence of multispecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron. **Corrosion Science**, 121, Junho 2017. 94-104.
- BAYOUDH, S. et al. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 318, 2008. 291-300.
- BEDDIE, D. et al. Beta acids and Rosin acids - 'Natural biocides to control micro-organisms throughout sugar factories'. **Zuckerindustrie** 127, 2002. 921-930.
- BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C. Recent advances in the study of Biocorrosion: an overview. **Revista de Microbiologia**, 1999. 177-190.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions. **LWT - Food Science and Technology**, 37, Março 2004. 273-268.

BHOLA, S. 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**, 22, n. 11, Novembro 2013. 3517-3529.

BHOLA, S. M. et al. Neem Extract as na inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: a preliminary investigation. **Engineering Failure Analysis**, Janeiro 2014. 92-103.

BOOTH, G. H. Sulphur Bacteria in relation to Corrosion. **Journal of applied Microbiology**, April 1964. 174-181.

BRASIL ESCOLA. **Site do Brasil Escola**, 21 Maio 2017. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/geografia/chuvaacida.htm>>. Acesso em: 30 Julho 2017.

BRUNE, A.; FRENZEL, P.; CYPIONLA, H. Life at the oxic–anoxic interface: microbial activities and adaptations. In: _____ **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Reviews**. Amsterdã: [s.n.], 2000. p. 691-710.

CAMPS, M. et al. Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. **Marine Pollution Bulletin**, 2011. 1032-1040.

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

CARVALHO, L. A. D.; ANDRADE, A. R. D.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, São Paulo, v. 29 n. 4, 24 Março 2006. 796-804.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. K.C. **Biofilms**. Nova Iorque: John Wiley & Son, 1990.

CHENG, G. et al. Corrosion and Electrochemical Behavior of 316L Stainless Steel in Sulfate-reducing and Iron-oxidizing Bacteria Solutions. **Chinese Journal of Chemical Eng.**, 14, Dezembro 2006. 829-834.

CLOETE, T. E.; JACOBS, L.; BROZEL, V. S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, Dordrecht, 9, Janeiro 1998. 23-27.

CORNAGO, P. C. A. M. The Cost of Corrosion in the Oil and Gas Industry. **JPCL**, Maio 1999. 30-40.

CORROSION CONSULTING SERVICES. **http:** //www.corrosionclinic.com, 2017. Disponível em: <http://www.corrosionclinic.com/types_of_corrosion/pitting_corrosion.htm>. Acesso em: 18 dez. 2017.

CRIZEL, M. M. **Alho: Características, processamento e benefícios à saúde E BENEFÍCIOS À SAÚDE**. Pelotas. 2009.

DENISSEN, P. J.; GARCIA, S. J. Cerium-loaded algae exoskeletons for active corrosion protection of coated AA2024-T3. **Corrosion Science**, 128, Novembro 2017. 164-175.

DUANA, J. et al. Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater. **Electrochimica Acta**, Qingdao, 54, 13 Maio 2008. 22-28.

EUROPEAN CORROSION FOUNDATION. Site da European Corrosion Foundation. **Site da European Corrosion Foundation**, 21 Maio 2017. Disponível em: <http://efcweb.org/efcweb_media/Attachment+8.pdf>. Acesso em: 30 Julho 2017.

FEDOTOVA, J. et al. Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant derived natural compounds and plant extracts. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 95, Novembro 2017. 437-446.

FEIO, M. J. et al. Desulfovibrio alaskensis sp. nov., a sulphatereducing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2004. 1747–1752.

FISCHER, E. R. et al. Scanning Electron Microscopy. In: FISCHER, E. R., et al. **Current Protocols in Microbiology**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2012. Cap. 2.

FLEMMING, H. C.; HEITZ, E.; SAND, W. Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC) - an economical and technical overview. **Microbial Deterioration of Materials**, 1996. 05-14.

FRANÇA, F. P. **Um pólo nacional de pesquisa sobre os biofilmes**. São Paulo: França Flash, 2006.

GENOME PORTAL. Genome Portal. **Site da Genome Portal**, 02 Abril 2017. Disponível em: <<http://genome.jgi.doe.gov/thide/thide.home.html>>. Acesso em: 05 Julho 2017.

GENTIL, V. **Corrosão**. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

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

GNEDENKOV, S. ; SINEBRYUKHOV, S. L.; SERGIENKO, V. I. Electrochemical impedance simulation of a metal oxide heterostructure/electrolyte interface: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, 42, Março 2006. 197-211.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H. **Perry Chemical Engineering Handbook**. New York: The McGraw Hill Companies, 1997.

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

GUNASEKARAN, G. et al. Influence of bacteria on film formation inhibiting corrosion. **Corrosion Science**, 46, 13 Janeiro 2004. 1953-1967.

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, 21, 01 Dezembro 1998. 21-30.

HAYAT, M. A. Chemical fixation. In: HAYAT, M. A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 28-45.

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

HEYDARIFARD, S. et al. Modification of cellulose foam paper for use as a high-quality biocide disinfectant filter for drinking water. **Carbohydrate Polymers**, 181, 1 fev. 2018. 1086-1092.

HIERONYMUS, S. **For The Love of Hops: The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops**. Colorado: Brewers Publication, 2012.

INCHEM. INCHEM. **Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations**, 07 Junho 2017. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/111308.pdf>>. Acesso em: 20 Agosto 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. **Site do Instituto de Pesquisas Tecnológicas**, 2017. Disponível em: <http://www.ipt.br/materiais_ref.php?m_tp=1&m_fm=1&familia=1>. Acesso em: 08 fev. 2017.

JACK, R. F.; WHITE, D. C.; RINDELBERG, D. B. Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus* sp., *Hafnia Alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm. **Corrosion Science**, 1992. 1843-1853.

JAMES, M. N.; HATTINGH, D. G. Case studies in marine concentrated corrosion. **Engineering Failure Analysis**, 47, 16 Setembro 2015. 1-15.

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.

JEONG, S. H. et al. New biocide for eco-friendly biofilm removal on outdoor stone monuments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 21 Junho 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.004>>.

JETTÉ, L. P. et al. Evaluation of three glutaraldehyde-based disinfectants used in endoscopy. **Journal of Hospital Infection**, 30, Agosto 1995. 295-303.

KEUKELEIRE, D. D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, 23, Janeiro/Fevereiro 2000. 108-112.

KING, R. A.; MILLER, J. D. A. Corrosion by the Sulphate-reducing Bacteria. **Nature**, 233, 15 Outubro 1971. 491-492.

LANGEZAAL, C. R.; CHANDRA, A.; SCHEFFER, J. J. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. **Pharmaceutisch weekblad. Scientific edition**, 11 Dezembro 1992. 353-356.

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, 23, Agosto 2011. 1394-1402.

LEC - USP. Site do Laboratório de Eletroquímica e Corrosão - Escola Politécnica da USP. **Site do Laboratório de Eletroquímica e Corrosão - Escola Politécnica da USP**, 08 Agosto 2017. Disponível em: <<http://sites.poli.usp.br/pqi/lec/nano/primarias/impedancia.htm>>. Acesso em: 30 Setembro 2017.

LEITE, I. R. et al. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, 2013. 611-618.

LEÔNEZ, A. C. Alimento e Saúde, Brasília, 2008. Disponível em: <http://bdm.unb.br/bitstream/10483/327/1/2008_AnaClaudiaLeonez.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2017.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S.; RAY, R. I. The influence of marine biofilms on corrosion: A concise review. **Electrochimica Acta**, 54, 1 Dezembro 2008. 2-7.

LIU, T. et al. Growth characteristics of thermophile sulfate-reducing bacteria and its effect on carbon steel. **Materials and Corrosion**, 60, n. 3, Março 2009. 218-224.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
MARINE CORROSION FORUM. Site da Marine Corrosion Forum. **Marine Corrosion Forum**, 21 Maio 2017. Disponível em:
<<https://www.marinecorrosionforum.org/explain.htm>>. Acesso em: 30 Julho 2017.

MARTINEZ, S.; VALEK, L. Copper corrosion inhibition by Azadirachta indica leaves extract in 0.5 M sulphuric acid. **Materials Letters**, 61, n. 1, Janeiro 2007. 148-151.

MATHIALAGAN, R. et al. Evaluation of Allicin as Soil Urease Inhibitor. **Procedia Engineering**, 184, 2017. 449-459.

MAXWELL, S. Controlling Corrosive Biofilms by the Application of Biocide. **Society of Petroleum Engineers**, Texas, Estados Unidos da América, Paper 93172, 2005.

MCCAFFERTY, E. **Introduction to Corrosion Science**. Washington, DC: Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2009.

MEDEIROS, M. Eletroquímica e Corrosão Metálica: Notas de Aula, 28 Maio 2017. Disponível em:
<http://www.dcc.ufpr.br/mediawiki/images/5/5c/TC030_Corrosao_Marcelo.pdf>. Acesso em: 28 Novembro 2017.

MEHANNA, M. et al. Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels. **Electrochemistry Communications**, 11, n. 3, Março 2009. 568-571.
MICHAEL T. MADIGAN, J. M. M. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MIRANDA, E. et al. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. **Corrosion Science**, 48, 2006. 2417-2431.

MONFREDA, C.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J. A. Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. **Global Biogeochemical Cycles**, 22, 01 Março 2008.

NACE. **Site da NACE International**, 25 Março 2016. Disponível em:
<<https://www.nace.org/Publications/Cost-of-Corrosion-Study/>>.

NACE INTERNACIONAL. Cost of Corrosion Study. **NACE Internacional**, Houston, 2002. Disponível em: <<https://www.nace.org/Publications/Cost-of-Corrosion-Study/>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

NACE INTERNATIONAL. **Laboratory Corrosion Testing of Metals - TM0169**. Houston. 2000.

NACE INTERNATIONAL. NACE International, 2017. Disponível em: <<https://www.nace.org/Corrosion-Central/Corrosion-101/Uniform-Corrosion/>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

NACE INTERNATIONAL. NACE International, 2017. Disponível em: <<https://www.nace.org/Pitting-Corrosion/>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

NAHLÉ, A. et al. UAE Neem Extract as a Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in HCl Solution. **International Journal of Corrosion**, 2010, 2010. 9.

O ARQUIVO. O Arquivo. **O Arquivo**, 16 Junho 2017. Disponível em: <<http://www.oarquivo.com.br/variedades/qualidade-de-vida/3930-alho-pode-reduzir-o-risco-de-c%C3%A2ncer-em-at%C3%A9-44-diz-estudo.html>>. Acesso em: 30 Agosto 2017.

ODON, J. M.; SINGLETON, R. J. **The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1993.

PAGNIN, S. **Formação de biofilmes em aço superduplex UNS S32750 em sistema dinâmico**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2008.

PAISAGISMO DIGITAL. Paisagismo Digital. **Paisagismo Digital**, 19 Junho 2017. Disponível em: <<https://paisagismodigital.com/Noticias/?id=%C3%81rvore-Nim:-um-dom-da-natureza&in=243>>. Acesso em: 30 Julho 2017.

PARTHIPAN, P. et al. Neem extract as a green inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel API 5LX in a hypersaline environments. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p.121-127, ago 2017.

PECK JR., H. D.; LEGALL, J. Biochemistry of dissimilatory sulphate reduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 1982. 443-466.

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

PERLINGEIRO, C. A. G. **Engenharia de Processos**. Rio de Janeiro: Edgard Blucher, 2005.

POLLACH, G.; HEIN, W.; DAVID, B. Application of hop β -acids and rosin acids in the sugar industry. **Zuckerindustrie**, 127, 2002. 921-930.
 POSTGATE, J. R. **The Sulphate-Reducing Bacteria**. [S.l.]: Cambridge University Press, 1984.

POURBAIX, M. **Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions**. Houston: NACE, 1974.

PUBCHEM - OPEN CHEMISTRY DATABASE. Pubchem - Open Chemistry Database. **Pubchem - Open Chemistry Database**, 16 Junho 2017. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allicin#section=Top>>. Acesso em: 30 Julho 2017.

QU, Q. et al. Effect of the fungus, *Aspergillus niger*, on the corrosion behaviour of AZ31B magnesium alloy in artificial seawater. **Corrosion Science**, 98, Setembro 2015. 249-259.

RAMASAMY, R. P. et al. Impact of Initial Biofilm Growth on the Anode Impedance of Microbial Fuel Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, Setembro 2008. 101-108.
 RENZO, D. J. D. **Corrosion Resistant Materials Handbook**. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1985.

SÁNCHEZ-MUNIZ, J. F.; GOMEZ, L. J. G. Revisión: Efectos Cardiovasculares del Ajo (*Allium sativum*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Setembro 2000. Disponível em: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222000000300002&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 jun 2017.

SANO, L. L.; KRUEGER, A. M.; LANDRUM, P. F. Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity. **Aquatic Toxicology**, 71, 10 Fevereiro 2005. 283-296.

SARAVIA, P. S. G. E. S. G. G. D. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. **Latin American Applied research**, Outubro/Dezembro 2005. 295-300.

SASSO, S. et al. Potential of natural biocides for biocontrolling phototrophic colonization on limestone. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2016. 102-110.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY LABORATORY. **Standard preparation of biological material for SEM analysis**. University of Silesia - Faculty of Biology and Environmental Protection. Silesia, p. 2. 2017.

SHARMA, S. et al. Corrosion inhibition of Neem (*Azadirachta indica*) leaves extract as a green corrosion inhibitor for Zinc in H₂SO₄. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 2, Setembro 2009. 47-51.

SHEELA, C. G.; KUMUD, K.; AUGUSTI, T. K. Anti-Diabetic Effects of Onion and Garlic Sulfoxide Amino Acids in Rats. **Planta Medica**, 61, 1995. 356-357.

SIDHU, O. P.; KUMAR, V.; BEHL, H. M. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with Respect to Azadirachtin Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Lucknow, 51, Março 2003. 910-915.

SILVA, F. B.; D'ELIA, R. S. A. E. E. Uso de Copaíba (*Copaifera L*) como inibidor da corrosão do aço-carbono 1020 em meio de cloreto. **XI Encontro da Sociedade Brasileira de Química - Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, L. M. D. **Anotações da Disciplina de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica - Introdução a análise de sistemas eletroquímicos no domínio da frequência**. [S.l.], p. 108. 2013.

SILVA, P. S. D. **Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutores de sulfato**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2015.

SOLTANI, S. R. et al. Evaluation of Antimicrobial Effect of Hops and *Ziziphora clinopodioides* Extracts on Intramacrophages *Listeria monocytogenes* by Agar Well Diffusion Method and Cell Culture of Macrophage. **Infection Epidemiology & Medicine**, 1, Julho 2013. 27-32.

STRUCHTEMEYER, C. G.; MORRISON, M. D.; ELSHAHED, M. S. critical assessment of the efficacy of biocides used during the hydraulic fracturing process in shale natural gas wells. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 71, Julho 2012. 15-21.

SWAROOP, B. S.; VICTORIA, S. N.; MANIVANN, R. *Azadirachta indica* leaves extract as inhibitor for microbial corrosion of copper by *Arthrobacter sulfureus* in neutral pH conditions—A remedy to blue green water problem. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 64,p. 269-278, jul 2016.

T. KIM, T. et al. Influence of attached bacteria and biofilm on doublelayer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. **Water Research**, Oxford, Inglaterra, 45, 2011. 4615-4622.

TELEGDI, J.; SHABAN, A.; TRIF, L. Microbiologically influenced corrosion (MIC). In: PUBLISHING, W. **Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies**. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 191-214.

TERRY, L. A.; EDYVEAH, R. G. J. Recent Investigations into the Effects of Algae on Corrosion. **Studies in Environmental Science**, Aberdeen, 28, 1986. 211-229.

THAUER, R. K.; BADZIONG, W. Respiration with sulfate as electron acceptor. **Diversity of Bacterial Respiratory Systems**, Boca Raton, 2, 1980. 65-85.

UNIVERSITY OF CHICAGO. UCHICAGO | iGEM 2013. **UCHICAGO | iGEM 2013**, 16 Junho 2017. Disponível em: <<http://2013.igem.org/Team:UChicago/Notebook>>. Acesso em: 25 Agosto 2017.

VIDELA, H. A. Biocorrosion of Nonferrous Metals Surfaces. In: GEESEY, G. G.; LEWANDOWSKI, Z.; FLEMMING, H. C. **Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems**. Boca Raton: Lewis Publisher, 1994. p. 231.

VIDELA, H. A. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais**. São Paulo: Blucher, 2003.

WE AT SEA. Site da We @ Sea. **Site da We @ Sea**, 21 Maio 2017. Disponível em: <<http://www.we-at-sea.org/wp-content/uploads/2009/02/3-Harald-vd-Mijle-Meijer.pdf>>. Acesso em: 30 Julho 2017.

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**, 2009. p.1102-1106.

WIKIPEDIA. **Wikipedia**, 2013. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Diagrama_de_Pourbaix>. Acesso em: 28 nov 2017.
WIKIPEDIA. **Wikipedia**, 16 Junho 2017. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Per%C3%B3xido_de_hidrog%C3%AAnio>. Acesso em: 30 Agosto 2017.

WOLFE, P. H. Site da Universidade Estadual de Oregon. **Site da Universidade Estadual de Oregon**, 26 Junho 2017. Disponível em: <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/34093/Wolfe_thesis.pdf>. Acesso em: 30 Agosto 2017.

WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. São Paulo: Edusp, 2003.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. **Bioelectrochemistry**, 110, p.52-58, ago. 2016.

YATAGAI, M. ; KUROSE, K. Components of the essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* Velton, and *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs and their comparison. **Journal of Wood Science**, v.51, p.185-188. abr 2005.

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**, v. 4, p.1103-1111, dez. 2010.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n. 6, p.1875-1881, jun. 1990.