Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Danielle Samira Ferreira Abdalla

Estudo da Corrosão Microbiológica em Tubulações de Sistemas de Proteção Contra Incêndio (*Sprinklers*) na Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato

Rio de Janeiro

2020

Danielle Samira Ferreira Abdalla

Estudo da Corrosão Microbiológica em Tubulações de Sistemas de Proteção Contra Incêndio (Sprinklers) na Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Lilian Ferreira de Senna

Coorientadoras: Prof.ª Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves

Prof.ª Dra. Dalva C. B. do Lago

Rio de Janeiro

2020

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

A135 Abdalla, Danielle Samira Ferreira.
Estudo da Corrosão Microbiológica em Tubulações de Sistemas de Proteção Contra Incêndio (Sprinklers) na Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato. – 2020.
99 f.

Orientador(a): Lilian Ferreira de Senna
Coorientador(a): Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Dalva C. B. do Lago

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química.

1. Corrosão – Teses. 2. Prevenção de acidentes – Teses. 3. Eletroquímica – Teses. I. Senna, Lilian Ferreira de. II. Gonçalves, Márcia Monteiro Machado. III. Lago, Dalva C. B. do. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 620.193

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

Danielle Samira F. Abdalla
Assinatura

20/06/2022
Data

Danielle Samira Ferreira Abdalla

Estudo da Corrosão Microbiológica em Tubulações de Sistemas de Proteção contra Incêndio (Sprinklers) na Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:

Profª. Dra. Lilian Ferreira de Senna (Orientadora)
Instituto de Química – UERJ

Profª. Dra. Márcia Monteiro M. Gonçalves (Orientadora)
Instituto de Química – UERJ

Profª. Dra. Dalva Cristina Baptista do Lago (Orientadora)
Instituto de Química – UERJ

Profª. Dra. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química – UERJ

Dra. Priscila Santos da Silva
Instituto Nacional de Tecnologia - INT

Profª. Dra. Renata Fernandes Braga Cordeiro
Instituto de Química – UFRJ

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui e não ter me deixado desistir.

Às minhas orientadoras pelos ensinamentos compartilhados com seus alunos, por toda dedicação aos seus trabalhos, pelo carinho, paciência, incentivo e ajuda na elaboração deste trabalho.

À minha filha que sem ela nada teria sentido.

Aos meus familiares pelo apoio durante esse período, compreensão, ajuda e pelos cuidados com minha filha nos momentos que eu precisei que cuidassem dela.

As alunas de iniciação científica que participaram da elaboração dessa dissertação, principalmente a aluna Ana Carolina cuja ajuda foi imprescindível na finalização do trabalho.

Aos técnicos do LEC por toda a ajuda e disponibilidade nos momentos que precisei de ajuda.

Aos amigos de trabalho do CEFET/RJ pela compreensão e apoio durante essa fase.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro por ter feito parte da minha vida na graduação e pós-graduação. Sou eterna admiradora dessa Universidade e dos profissionais que a fazem se manter de “pé”. Sou grata a todos os conhecimentos adquiridos no tempo em que permaneci lá.

E a todos que colaboraram de alguma forma para que eu chegasse ao final deste trabalho e que não me deixaram desistir em meio a tantas dificuldades.

RESUMO

ABDALLA, Danielle Samira Ferreira. *Estudo da Corrosão Microbiológica em Tubulações de Sistemas de Proteção Contra Incêndio (Sprinklers) na Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato*. 2020. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Sprinklers são equipamentos de proteção contra incêndio que atuam descarregando água a fim de extinguir um incêndio de forma rápida e automática, impedindo a propagação do fogo. A maioria das tubulações usadas nesses sistemas são construídas de aço carbono. Os sistemas de *sprinklers* proporcionam um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos que promovem a oxidação interna das tubulações e, consequentemente, a corrosão. Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são os principais microrganismos envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI), que, em geral, ocorre de forma localizada. Uma das formas de controle desse tipo de corrosão é a adição de biocidas. Porém, a maioria dos biocidas comercializados são tóxicos e possuem difícil degradação. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento da CMI no aço carbono 1020 em água de *sprinkler* industrial como meio eletrolítico, na ausência e na presença de uma cultura de microrganismos contendo BRS, nos tempos de ensaio de 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Além disso, foi avaliado um biocida natural, o óleo de nim, como alternativa no tratamento da água utilizada em sistemas de *sprinklers* e comparado com o glutaraldeído, que é um biocida usado comercialmente. A quantificação bacteriana das BRS sésseis foi avaliada pelo método no número mais provável (NMP). A avaliação da corrosão foi feita por técnicas eletroquímicas potencial de circuito aberto (OCP), curvas de polarização potenciodinâmica (PP) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A formação de biofilme e produtos de corrosão na superfície do aço foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A caracterização da superfície do aço carbono foi feita pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). Foi observado um baixo crescimento de BRS aderidas ao material devido à pequena concentração de sulfato no meio. Um valor máximo (5,6 células/cm^2) foi verificado em 14 de incubação. A avaliação do OCP mostrou enobrecimento do material, devido à formação do biofilme em sua superfície. Os ensaios de EIE indicaram uma aceleração do processo corrosivo no meio na presença de BRS, sendo evidenciado pelo deslocamento das curvas para menores valores de frequência nos diagramas de Bode (Módulo e Fase). Na análise de MEV, realizada no tempo de ensaio de 14 dias, foi possível observar a formação de um biofilme na superfície do material com distribuição não uniforme. Após a remoção do biofilme, foi verificada a presença de pites. A adição dos biocidas foi realizada para o tempo de ensaio de 14 dias e impediu o crescimento de BRS na superfície do aço carbono. Os ensaios eletroquímicos na presença de biocidas

evidenciaram uma diminuição do processo corrosivo, quando comparados com os ensaios sem biocidas realizados pelo mesmo período de tempo.

Palavras-chave: Corrosão microbiologicamente induzida. *Sprinklers*. Bactérias redutoras de sulfato. Técnicas eletroquímicas. Biocidas.

ABSTRACT

ABDALLA, Danielle Samira Ferreira. *Study of Microbiological Corrosion in Pipes of Fire Protection Systems (Sprinklers) in the Presence of Sulphate Reducing Bacteria.* 2020. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Sprinklers are fire protection equipment that discharge water in order to extinguish a fire quickly and automatically, preventing the spread of fire. Most of pipes used in these systems are constructed of carbon steel. Sprinklers systems provide an ideal environment for the growth of microorganisms that promote internal oxidation of the pipes and, consequently, corrosion. Sulphate-reducing bacteria (SRB) are the most important microorganisms involved in microbiologically induced corrosion (MIC) that generally occurs localized. One way to control this type of corrosion is the addition of biocides. However, most of the commercialized biocides are toxic and have difficult degradation. Therefore, the objective of this work was to evaluate the MIC behavior of carbon steel AISI 1020 in industrial sprinkler water in the absence and presence of mixed culture of microorganisms containing sulfate-reducing bacteria (SRB). The tests were carried out at 3, 7, 14, 21 and 28 days. In addition, a natural biocide, neem oil, was evaluated as an alternative in the treatment of water used in sprinkler systems and compared with glutaraldehyde, which is a biocide used commercially. Microbial growth on the steel surface was measured by quantifying the sessile SRB using the most probable number (MPN). The corrosion evaluation was performed by electrochemical techniques (open circuit potential (OCP), potentiodynamic polarization curves (PP) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS)). The biofilm formation and the corrosion products on the steel surface were observed by scanning electron microscopy (SEM). The carbon steel surface characterization was observed by energy dispersive spectroscopy (EDS). Was observed a low growth of SRB adhered to the material due to the little concentration of sulfate in the medium. A maximum value was verified in 14 days of incubation. The OCP evaluation showed ennoblement of the material, due to the formation of the biofilm on surface. EIE indicated an acceleration of the corrosive process in the presence of SRB, evidenced by the displacement of the curves to lower frequency values in the Bode (Module and Phase diagrams. SEM analysis, performed in 14 days, was observed the formation of a non-uniform biofilm on the surface of the material. After the biofilm removal, the presence of pits was verified. The addition of the biocides was carried out for the time of 14 days and prevented the growth of SRB on the surface of the carbon steel. Electrochemical tests in the presence of biocides showed a decrease in the corrosive process compared with the tests without biocide performed on the same time period.

Keywords: Microbiologically induced corrosion. Sprinkler. Sulfate-reducing bacteria. Electrochemical techniques. Biocides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de Formação do Biofilme 19
Figura 2 - Morfologias das BRS. (A) Desulfovibrio; (B) Desulfobulbus. 23
Figura 3 - Metabolismo das BRS. 24
Figura 4 - Bioquímica da redução de sulfato: Redução assimilativa e dissimilativa. . 25
Figura 5 - Esquema da teoria de despolarização catódica 27
Figura 6 - Biocorrosão por aeração diferencial 28
Figura 7 - Fórmula estrutural do glutaraldeído 34
Figura 8 - Exemplo de Diagrama de Nyquist para um processo de corrosão de cobre na presença de BRS. 41
Figura 9 - Exemplos de diagramas de Bode e Fase para um processo corrosivo de aço carbono em água utilizada em torre de resfriamento. 42
Figura 10 - Representação esquemática das curvas de polarização em um diagrama monologarítimico. E = potencial de eletrodo; Ee = potencial de equilíbrio; Θ = inclinação da reta anódica, γ - inclinação da reta catódica; i - densidade de corrente; βa e βc – constante 44
Figura 11 - Corpos de prova utilizados nos ensaios de quantificação celular e avaliação morfológica (A) e ensaios eletroquímicos (B). 47
Figura 12 - Água utilizada para isolar a cultura de bactérias utilizada no trabalho e para a realização de todos os ensaios. 48
Figura 13 - Biorreator contendo o meio de cultura Baar'r modificado 53
Figura 14 - Biorreator utilizado para o ensaio de quantificação microbiana contendo o corpo de prova, imerso no meio de cultura por meio de uma fita de teflon. 54
Figura 15 - Biorreatores utilizados para os ensaios eletroquímicos com o corpo de prova imerso no meio de cultura na ausência e na presença de BRS. 54
Figura 16 - Organização da caixa para o ensaio de quantificação microbiana. 55
Figura 17 - Frascos de penicilina após o ensaio de quantificação microbiana. 56
Figura 18 - Célula eletroquímica contendo três eletrodos. 57
Figura 19 - Quantificação microbiana para células sésseis 61
Figura 20 - Potencial de circuito aberto (OCP) do aço carbono 1020 em meio de água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para todos os tempos de ensaio na ausência (abiótico) e na presença (biótico) de BRS 63
Figura 21 - Diagrama de Nyquist para o aço carbono 1020 em água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura na ausência (A) e na presença (B) de BRS (continua) 65
Figura 22 - |Z| para o aço carbono 1020 em água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (A) e na presença (B) de BRS. 65

Figura 23 - Diagrama de Fase para o aço carbono 1020 em água de sprinkler industrial com 0,2mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (A) e na presença (B) de BRS. 67
Figura 24 - Modelos de circuitos equivalentes utilizados para simular os dados de EIE nos tempos de 7, 14 e 21 dias (A) e 3 e 28 dias (B), sendo: (Re - resistência do eletrólito, Rtc - resistência à transferência de carga, EFC - elemento de fase constante). 69
Figura 25 - Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para os tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias de ensaio, na ausência (A) e na presença (B) de BRS (continua). 74
Figura 26 - Quantificação microbiana de células sésseis para os ensaios com biocidas e para o ensaio biótico..... 77
Figura 27 - Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, previamente incubado em meio na ausência e na presença de BRS e os biocidas estudados, em meio de água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$. 79
Figura 28 - Diagrama de Nyquist (A), |Z| (B) e Fase (C) para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ previamente incubado na ausência (abiótico), presença (biótico) e com a adição dos biocidas estudados por 14 dias (continua)..... 81
Figura 29 - Circuito elétrico utilizado na simulação dos dados de EIE para o ensaio com a adição de glutaraldeído..... 82
Figura 30 - Curvas de polarização potenciodinâmica para o aço carbono 1020 em meio de água de sprinkler industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para os ensaios na ausência e na presença de BRS bem como os ensaios após a adição dos biocidas no tempo de incubação do corpo de prova em 14 dias..... 85
Figura 31 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 com aumento de 1000x após 14 dias de incubação em meio abiótico (A), biótico (C), contendo glutaraldeído (E) e contendo óleo de nim. As micrografias B (abiótico), D (biótico), F (glutaraldeído) e G (óleo de nim) são após a decapagem do material. 87
Figura 32 - Micrografias da superfície do aço carbono 1020 com aumento de 1000x em 14 dias de ensaio, após a decapagem em meio abiótico (A), biótico (B), contendo glutaraldeído (C) e óleo de nim (D)..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos realizados com biocidas, naturais ou não, encontrados na literatura 32
Tabela 2 - Composição do óleo de nim. 35
Tabela 3 - Composição química em % massa do aço carbono AISI 1020. 46
Tabela 4 - Composição do Meio Postgate C 50
Tabela 5 - Composição do meio Baar's modificado. 51
Tabela 6 - Composição do meio Postgate E modificado. 52
Tabela 7 - Composição da solução de diluição. 52
Tabela 8 - Características da água de *sprinkler* utilizada nos ensaios.....60
Tabela 9 - Parâmetros simulados em circuitos equivalentes para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2mol L^{-1} de $NaNO_3$ na presença (abiótico) e na ausência (biótico de bactéria). 71
Tabela 10 - Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da extrapolação das retas de Tafel para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ nos tempos de i3, 7, 14, 21 e 28 dias de ensaio na ausência (abiótico) e presença (biótico) de BRS.....75
Tabela 11 - Parâmetros simulados em circuitos equivalentes para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ na presença (abiótico) e na ausência (biótico) de bactéria e após a adição de biocidas para o tempo de incubação do corpo de prova de 14 dias. 83
Tabela 12 - Parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ em meio abiótico, biótico e após a adição de biocidas para o tempo de imersão do corpo.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
C_{DCE}	Capacitância da dupla camada elétrica
DRX	Difração de Raios X
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X
EFC	Elemento de Fase Constante
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NMP	Número Mais Provável
OCP	Potencial de Circuito Aberto (Open Circuit Potential)
PP	Polarização Potenciodinâmica
R_e	Resistência do eletrólito
R_{tc}	Resistência de transferência de carga
SPE	Substância Polimérica Extracelular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **15**
OBJETIVOS **17**
OBJETIVO GERAL 17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**
1.1 **Corrosão microbiologicamente induzida (CMI)** 18
1.2 **Biofilmes** 18
1.3 **Microrganismos envolvidos no processo de biocorrosão** 20
1.3.1 Bactérias 20
1.3.1.1 Bactérias oxidantes de ferro 21
1.3.1.2 Bactérias produtoras de ácidos 22
1.3.1.3 Bactérias redutoras de sulfato (BRS) 22
1.3.1.3.1 Metabolismo das BRS 23
1.4 **Mecanismos envolvidos na biocorrosão** 26
1.4.1 Despolarização catódica 26
1.4.2 Formação de células de aeração diferencial 27
1.4.3 Produção de metabólitos corrosivos 28
1.5 **Uso de biocidas no controle da biocorrosão** 29
1.5.1 Glutaraldeído 34
1.5.2 Óleo de nim 35
1.6 **Monitoramento da biocorrosão** 37
1.6.1 Métodos microbiológicos 37
1.6.2 Métodos físico-químicos 38
1.6.3 Métodos de avaliação qualitativa e semi-quantitativa da CMI 38
1.6.4 Métodos eletroquímicos 39
1.6.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) 40
1.6.4.2 Polarização potenciodinâmica 43
2 MATERIAIS E MÉTODOS **46**
2.1 **Corpos de prova** 46
2.2 **Fluido de processo e preparo do inóculo** 48

2.3 **Meios de cultura** 51
2.4 **Sistemas utilizados para os ensaios eletroquímicos (abióticos e bióticos) e para os ensaios de quantificação microbiana** 52
2.5 **Quantificação microbiana** 55
2.6 **Ensaios eletroquímicos** 57
2.7 **Ensaios com biocidas** 58
2.8 **Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)** 59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
3.1 **Avaliação da corrosão microbiologicamente induzida** 60
3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano 60
3.1.2 Ensaios eletroquímicos 62
3.1.2.1 Potencial de circuito aberto (OCP) 62
3.1.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) 64
3.1.2.3 Polarização potenciodinâmica 73
3.1.3 Ensaios com Biocidas 76
3.1.3.1 Avaliação do crescimento microbiano 77
3.1.3.2 Ensaios eletroquímicos 78
3.1.3.2.1 Potencial de circuito aberto (OCP) 78
3.1.3.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica 80
3.1.3.2.3 Polarização potenciodinâmica 84
3.1.3.2.4 Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) 86

INTRODUÇÃO

Sprinkler é um dispositivo muito utilizado no combate a incêndios. A instalação de um sistema de *sprinkles* consiste basicamente de uma rede de bicos de *sprinklers* adequadamente distribuídos e interligados por tubulações aéreas e conexões. Esses sistemas de combate a incêndio são muito utilizados em todo o mundo em edifícios comerciais, casas, escolas e apartamentos. Os sistemas de *sprinklers* podem ser classificados em secos ou molhados, dependendo se as tubulações de distribuição de água permanecem cheias ou não. Os sistemas de tubos molhados consistem em circuitos fechados em que as tubulações permanecem preenchidas com água pressurizada durante todo o tempo. Nos sistemas de tubos secos, as tubulações são preenchidas com ar comprimido. Quando o chuveiro se abre, o ar é liberado e a queda de pressão na linha abre a válvula de entrada de água. Os sistemas de *sprinkler* molhados são mais frequentemente instalados por serem mais confiáveis, serem mais simples e mais econômicos do que os sistemas secos, tanto na instalação, quanto na manutenção. Ambos os sistemas criam um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos que podem provocar alterações eletroquímicas na superfície no material acelerando o processo corrosivo.

Quando a corrosão ocasionada ou acelerada pela presença de microrganismos é definida como corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Os principais microrganismos envolvidos na CMI são as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Essas bactérias são capazes de reduzir o sulfato produzindo, dependendo do pH do meio, sulfeto de hidrogênio. Esse produto combina-se com o íon ferroso e forma o sulfeto de ferro II, que possui coloração preta (MADIGAN, 2016). As BRS podem ser planctônicas (estão presentes no fluido de processo) ou sésseis (estão aderidas à superfície metálica, participando da formação do biofilme). Essas bactérias podem ser encontradas em muitos ambientes incluindo o solo e águas doces e salgadas.

Na indústria de proteção contra incêndio, as bactérias causadoras de CMI tornaram-se uma preocupação em 1998, quando sua presença foi detectada em uma casa de repouso no momento em que o sistema de *sprinkler* apresentou defeito em seu funcionamento quando foi disparado por um incêndio. (CHARTIER, 2004).

O uso de biocidas é amplamente utilizado no tratamento de águas industriais a fim de evitar o crescimento microbiano e consequentemente a formação de biofilme.

Porém, a maioria dos biocidas disponíveis comercialmente são tóxicos para o meio ambiente. A indústria de proteção contra incêndio se preocupa com a utilização de biocidas tóxicos no tratamento de águas utilizadas nos sistemas de *sprinklers* não somente pelo meio ambiente, mas também devido as pessoas expostas em caso da necessidade do acionamento de seus sistemas diante de uma situação de incêndio.

Sendo assim, devido à importância da ação das bactérias redutoras de sulfato na corrosão de materiais utilizados nas tubulações de sistemas de *sprinklers*, o presente trabalho avaliou a corrosão microbiológica em aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* fornecida por uma indústria farmacêutica no Rio de Janeiro na presença de bactérias redutoras de sulfato. Além disso, pensando na mitigação desse processo corrosivo, foi avaliada a aplicação de um biocida natural, o óleo de nim, como alternativa ao glutaraldeído, que é um biocida utilizado comercialmente no tratamento de águas industriais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar o comportamento da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) do aço carbono AISI 1020 em água de *sprinkler* industrial, na ausência e na presença de uma cultura mista de microrganismos contendo bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Objetivos Específicos:

- Avaliar o crescimento microbiano de uma cultura mista contendo BRS em água de *sprinkler* industrial e correlacionar com a corrosão do aço carbono 1020 utilizando técnicas eletroquímicas de impedância e polarização potenciodinâmica;
- Verificar a formação de biofilmes na superfície do aço carbono, e identificar um possível ataque ao substrato, após a remoção desse biofilme, por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a superfície do aço carbono 1020 através da técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raio X (EDS);
- Avaliar o controle da CMI através da adição de um biocida natural (óleo de nim) e um comercial (glutaraldeído), adicionados ao meio de forma a evitar a formação do biofilme através de técnicas de quantificação, eletroquímicas e MEV.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Corrosão microbiologicamente induzida (CMI)

Corrosão microbiologicamente induzida (CMI) ou biocorrosão pode ser definida como o processo eletroquímico de dissolução metálica, iniciado ou acelerado por microrganismos (VIDELA, 2003).

A biocorrosão acontece através do contato de um metal com águas industriais ou naturais ocorrendo processos biológicos (produção de *biofouling*) e processos inorgânicos (VIDELA, 2003). A palavra *biofouling* é referente ao acúmulo indesejável de depósitos biológicos sobre uma superfície (CHARACKLIS, 1990). Geralmente, biofouling é resultante do acúmulo de biofilmes, que é formado por células imobilizadas sobre um substrato, incluídas em uma matriz orgânica de polímeros extracelulares produzidos pelos microrganismos, denominada de material polimérico extracelular (MPE) (VIDELA, 2003).

A CMI é encontrada em muitas indústrias, tais como óleo e gás, tratamento de água, têxtil, nuclear, polpa, papel e outras indústrias, em que a água é usada em parte do processo (CHARTIER, 2004). Embora a CMI não seja um problema novo, ela só se tornou uma preocupação na indústria de incêndio no ano de 1998.

Apesar de se ter conhecimento sobre os atributos fisiológicos de uma grande variedade de microrganismos, ainda se sabe pouco sobre os processos da corrosão microbiologicamente induzida. A dificuldade dessa explicação deve-se a necessidade de conhecimentos em diferentes áreas como microbiologia, metalurgia, eletroquímica e engenharia química, a fim de se entender a complexa interação entre microrganismos, a superfície metálica em que habitam, o metabólito que produzem e como eles afetam os processos de corrosão (LV; DU, 2018).

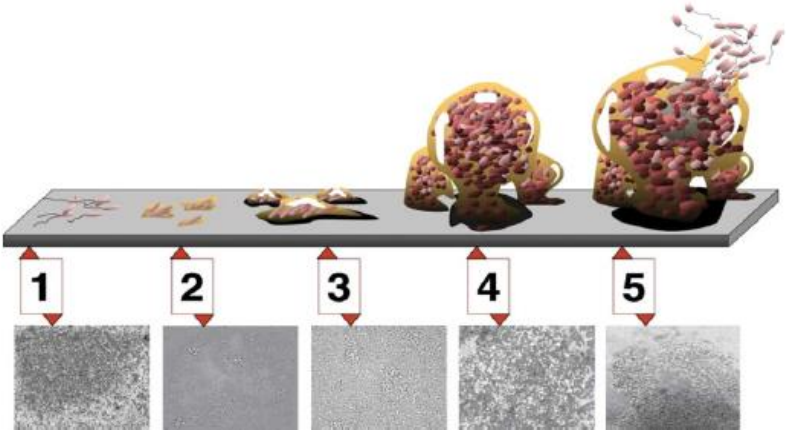
1.2 Biofilmes

Biofilme é conhecido como um filme fino que é formado quando as bactérias se ligam a superfícies metálicas (GEESEY,1993). São definidos por Characklis e

Marshall (1990) como células imobilizadas em um substrato que é frequentemente incorporado em uma matriz polimérica orgânica de origem microbiana (DEXTER; LAFONTAINE, 1998). Pode-se dizer também que o biofilme consiste em uma comunidade de bactérias, água, substâncias poliméricas extracelulares (SPE), produtos de corrosão, etc. (ALABBAS et al., 2013).

A Figura 1 mostra as diferentes etapas de formação de biofilmes microbianos. No estágio 1, há uma ligação inicial das células planctônicas com a superfície do metal. Na etapa 2, ocorre uma fixação irreversível de células bacterianas através da formação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Na 3, uma camada de biofilme é formada. No estágio 4, há uma maturação de um estado estacionário na camada de biofilme e no 5 ocorre um deslocamento de células bacterianas da superfície externa do biofilme.

Figura 1 - Etapas de Formação do Biofilme



Fonte: CHITRA et al., 2014.

Videla (2003) explica a etapa de formação do biofilme da seguinte maneira: primeiramente há a formação de um filme de moléculas orgânicas, modificando o molhamento e a distribuição de cargas na superfície sólida, o que facilita a aderência dos microrganismos presentes no líquido, que é causada principalmente por forças físicas e interações eletrostáticas, sendo um processo reversível, ou seja, pode ser eliminada facilmente por meio de um jato de água, por exemplo. As células microbianas que permanecem na superfície se multiplicam e produzem uma matriz polimérica extracelular (MPE), que se adere firmemente à superfície.

À medida que a espessura do biofilme aumenta e supera a camada-limite de fluxo laminar, tem início o desprendimento das camadas mais externas (por efeito do corte do fluxo de líquido).

Os biofilmes nunca são uniformes na superfície do metal, tornando o ambiente químico na superfície diferente daquele da solução, criando células que facilitam e estabilizam o processo de corrosão do tipo localizada, causando vários problemas industriais, muitos deles com graves consequências (GEORGE; MARSHALL; NEWMAN, 2003).

1.3 Microrganismos envolvidos no processo de biocorrosão

São vários os microrganismos que contribuem para a corrosão incluindo as bactérias, fungos e arqueas. Em ambientes em que a temperatura pode facilmente atingir 70°C ou mais, as arqueas são importantes (STETTER et al., 1993). Os fungos são um fator importante nas investigações de biocorrosão em climas quentes e úmidos como no caso do Sudeste Asiático (STETTER et al., 1993). Já as bactérias são os principais microrganismos envolvidos nos casos de biocorrosão, sendo o foco da maioria dos estudos publicados sobre o assunto (JIA et al., 2019). Esses microrganismos serão detalhados a seguir. Dentro do grupo das bactérias, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas as de maior impacto na biocorrosão devido ao sulfato ser amplamente distribuído em ambientes anóxicos (LV; DU, 2018).

1.3.1 Bactérias

Podem estar associadas aos processos de corrosão, tanto as bactérias anaeróbicas quanto as aeróbicas. Como exemplo de bactérias aeróbicas que estão presentes em ambientes naturais e causam corrosão em estruturas de aço pode-se citar as bactérias oxidantes de ferro e, como anaeróbicas, tem-se as bactérias redutoras de sulfato (ASHASSI- SORKHABI et al. 2012; SAND E GEHRKE, 2003).

As principais bactérias encontradas nas tubulações molhadas dos sistemas de proteção contra incêndio são as bactérias oxidantes de ferro, as bactérias produtoras de ácidos e as bactérias redutoras de sulfato. Essas bactérias serão descritas a seguir.

1.3.1.1 Bactérias Oxidantes de ferro

São bactérias que transformam o íon Fe^{2+} em íon Fe^{3+} durante o seu metabolismo, sendo dessa forma, um conjunto de microrganismos potenciais de provocar e/ou acelerar a corrosão. (PAULA, 2010).

As bactérias oxidantes de ferro mais conhecidas são as *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* e crescem autotroficamente utilizando o íon ferroso como doador de elétrons (MADIGAN et al., 2016). Ambos os organismos têm um crescimento ótimo em ambientes com valores de pH entre 2 e 3, podendo crescer em pH abaixo de 1. São comuns em ambientes poluídos por ácidos como os escoadouros de minas de carvão. Algumas bactérias oxidantes de ferro como as *Gallionella ferruginea* e *Sphaerotilus natans,* podem viver em ambientes de pH neutro, nas situações em que o íon ferroso está sendo mobilizado de condições anóxicas para óxicas (MADIGAN et al., 2016).

As bactérias oxidantes de ferro podem provocar diferentes tipos de corrosão no aço a partir da oxidação do Fe (II), sendo a principal a corrosão do tipo localizada (MORADI et al., 2011; STAROSVETSKY et al, 2008).

Outro fator importante é que em um biofilme, bactérias oxidantes de ferro aeróbicas ou facultativas podem fornecer um ambiente livre de oxigênio, propício para o crescimento de bactérias redutoras de sulfato. Um estudo feito por Liu et al. (2015), mostrou que uma cultura mista contendo bactérias oxidantes de ferro e bactérias redutoras de sulfato, ocasionaram corrosão mais severa do ferro do que culturas puras de cada bactéria (JIA et al., 2019).

Além da corrosão, essas bactérias são capazes ainda de produzir flóculos e depósitos (inorgânico e biológico) nos sistemas de água industriais, reduzir a permeabilidade do solo e produzir entupimentos na indústria de extração de petróleo (VIDELA, 2013).

1.3.1.2 Bactérias produtoras de ácidos

As bactérias produtoras de ácidos são aquelas em que as reações metabólicas resultam na produção de ácidos, seja orgânico ou inorgânico (LOTO, 2017). A produção de ácidos ocasiona uma redução no pH do meio, favorecendo a dissolução metálica e contribuindo assim para o processo corrosivo. Sabe-se que o pH em um biofilme é menor que o do meio. Em valores de pH baixos, o ataque de prótons é termodinamicamente favorável quando associado à oxidação de ferro. Neste caso, as células planctônicas podem contribuir para a corrosão, devido à produção de prótons ajudando na manutenção de um ambiente ácido (JIA et al., 2019). A produção de ácidos orgânicos no interior do biofilme pode, além de promover a dissolução metálica, atuar como fonte de carbono para os microrganismos presentes, permitindo a viabilidade das células que também são capazes de acelerar as reações envolvidas no processo corrosivo (WILLIAMSON et al., 2015).

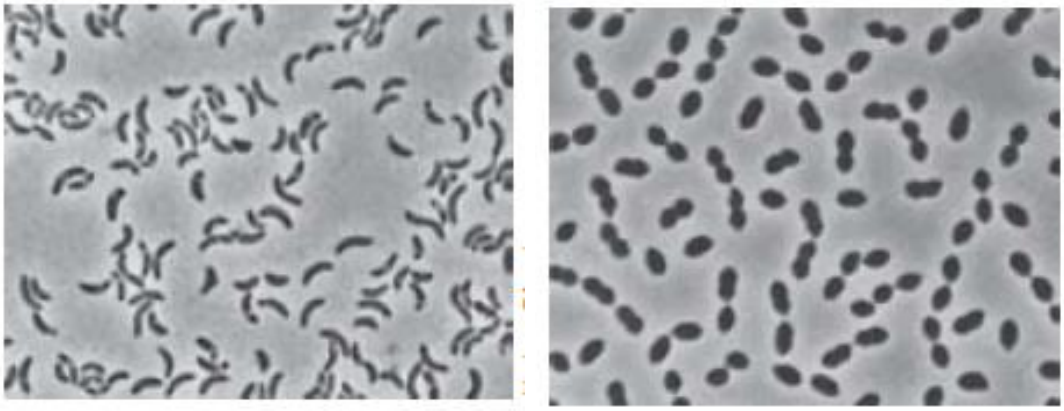
1.3.1.3 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As BRS são consideradas os principais microrganismos causadores da CMI, seja pela produção de metabólitos corrosivos ou pelo mecanismo de despolarização catódica, acelerando a reação anódica no substrato (VIDELA, 2003). Como as bactérias redutoras de sulfato são o foco de estudo do presente trabalho, serão melhor detalhadas a seguir.

Com relação a sua morfologia, as BRS podem se apresentar como bacilos curvos ou espiralados, com 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e 3,0 a 5,0 µm de comprimento (VIDELA, 2003).

As BRS obtêm energia através da conexão entre a oxidação de H_2 ou de compostos orgânicos e a redução de SO_4^{2-} (MADIGAN et al., 2016). As BRS, inicialmente foram divididas em dois grupos, o *Desulfovibrio* (cinco espécies) e o *Desulfotomaculum* (sete espécies) (VIDELA, 2003). Atualmente, existem mais de 30 gêneros dos microrganismos denominados bactérias redutoras de sulfato (MADIGAN et al., 2016). Na Figura 2 são apresentados dois gêneros de bactérias redutoras de sulfato.

Figura 2 - Morfologias das BRS. (A) *Desulfovibrio*; (B) *Desulfobulbus*



Fonte: MADIGAN et al., 2016.

Para o seu crescimento, as BRS utilizam o H_2 ou compostos orgânicos como doadores de elétrons. São microrganismos descritos como anaeróbios obrigatórios, porém, algumas bactérias redutoras de sulfato são relativamente tolerantes ao oxigênio (MADIGAN et al., 2016). Elas crescem em uma faixa de temperatura entre 25°C e 44°C e pH entre 5,5 e 9,0 (VIDELA, 2003). Porém, existem algumas que crescem em temperaturas superiores a 70°C (ANDRADE, 2013).

Quando há o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, o H_2S, formado pela redução do SO_4^{2-}, combina-se com o ferro ferroso formando o sulfeto de ferro II, que possui a coloração preta e é insolúvel (MADIGAN et al., 2016). As BRS podem estar presentes nos mais diversos ambientes como solo, águas doces e salgadas e intestino de vários animais. Além disso, podem ser planctônicas ou sésseis, participando da formação do biofilme (SILVA, 2013).

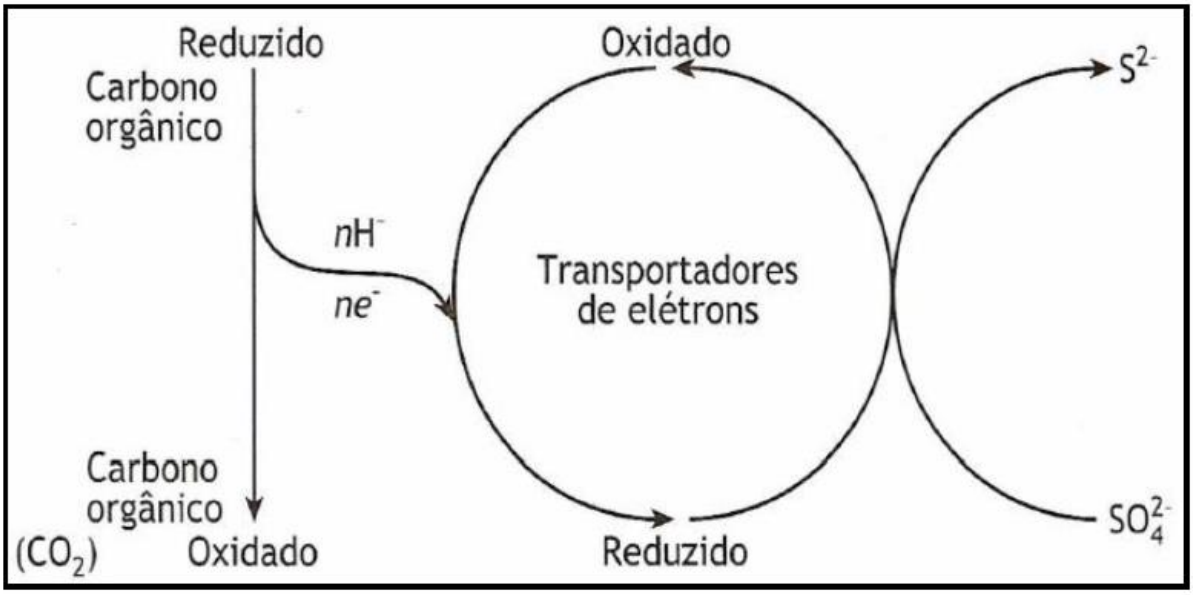
Apesar das bactérias redutoras de sulfato serem amplamente distribuídas na natureza, em muitos ambientes anóxicos como a água doce e diversos solos, a redução de sulfato é limitada devido às baixas concentrações de sulfato existentes nesses ambientes. Além disso, a produção de sulfeto só ocorre na presença de quantidades significativas de compostos orgânicos (MADIGAN, et al. 2016).

1.3.1.3.1 Metabolismo das BRS

Organismos como plantas, algas, fungos e a maioria dos procariotos, utilizam o sulfato como fonte de enxofre para as necessidades biossintéticas. Porém, para utilizar o sulfato como um aceptor de elétrons nos processos de geração de energia é necessária a redução em grande escala de SO_4^{2-}, processo limitado às bactérias redutoras de sulfato (MADIGAN et al., 2016).

Com relação à função metabólica, as BRS são classificadas em dois grupos, sendo o primeiro os oxidantes completos, que oxidam completamente os compostos orgânicos a CO_2 no qual pertencem espécies do gênero *Desulfobacter, Desulfobacterium, Desulfococcus, Desulfonema, Desulfosarcina, Desulfoarculus, Desulfoacinum, Desulforhabdus* e *Desulfomonile*. O segundo grupo são os oxidantes incompletos, no qual realizam a oxidação incompleta de compostos orgânicos a acetato e CO_2. Espécies como *Desulfovibrio, Desulfomicrobium, Desulfobotulus, Desulfofustis, Desulfotomaculum, Desulfomonile, Desulfobacula, Archaeoglobus, Desulfobulbus, Desulforhopalus* e *Thermodesulfobacterium* fazem parte desse grupo (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009). A Figura 3 mostra o metabolismo das BRS, processo que envolve três etapas: a oxidação dos compostos orgânicos (substratos), o transporte de elétrons e a redução dos íons sulfato.

Figura 3 - Metabolismo das BRS



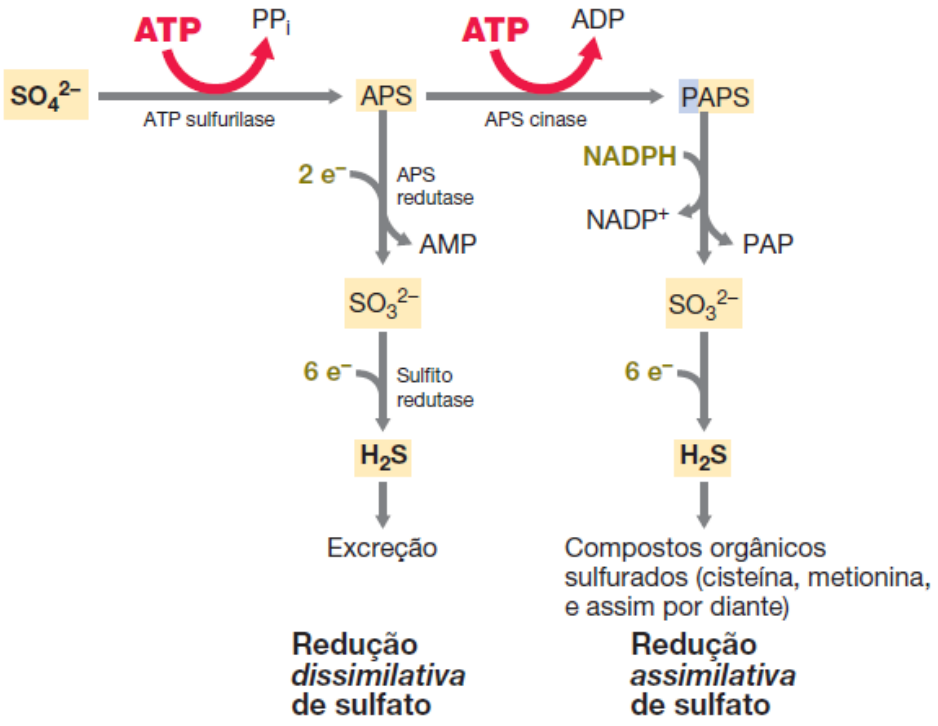
Fonte: VIDELA, 2003.

Os substratos energéticos que são bastante utilizados pelas diferentes espécies de BRS são H_2 (CO_2 como fonte de carbono), lactato e piruvato. Os demais compostos são de uso mais restrito. A redução do sulfato tem como produto final o

sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é um produto natural importante no qual participa de muitos processos biogeoquímicos. (MADIGAN et al., 2016).

A redução do sulfato pode ocorrer de duas formas, através de vias assimilativa e dissimilativa. Nesta última, o sulfeto de hidrogênio é formado em larga escala pelas BRS e excretado para que seja oxidado pelo ar, utilizado por outros organismos ou combinados com metais para formar sulfetos metálicos (MADIGAN et al., 2016). Na Figura 4 é representada a bioquímica de redução do sulfato.

Figura 4 - Bioquímica da redução de sulfato: Redução assimilativa e dissimilativa



Fonte: MADIGAN et al., 2016.

A redução de SO_4^{2-} a H_2S acontece por intermédio de vários estágios intermediários. O sulfato é ativado por meio da ATP. A enzima ATP sulfurilase catalisa a ligação do íon sulfato a um fosfato da ATP, formando *adenosina –fosfosulfato (APS, adenosine phosphosulfate)*. Na redução dissimilativa, o sulfato presente na APS é reduzido, pela enzima APS redutase, diretamente a sulfito (SO_3^2) com a liberação de AMP. Na redução assimilativa do sulfato, outro fosfato é adicionado a APS, formando a *fosfoadenosina-fosfossulfato (PAPS*, *phosphoadenosine phosphosulfate).* Somente

então, o sulfato é reduzido. Em ambos os casos, há a formação de sulfito (SO_3^{2-}) como produto da redução de sulfato, que, uma vez formado, a enzima sulfito redutase leva a formação de sulfeto.

1.4 Mecanismos envolvidos na biocorrosão

Os microrganismos não modificam a natureza eletroquímica da corrosão, e sim induzem ou aceleram a reação de corrosão por diferentes efeitos metabólicos (VIDELA, 2003).

A seguir, serão descritos alguns dos mecanismos envolvidos na CMI.

1.4.1 Despolarização catódica

A “teoria da despolarização catódica” ou “teoria clássica” foi proposta pela primeira vez em 1934 pelos autores Kuhr e Vlugt para evidenciar que a corrosão anaeróbica foi ocasionada pela atividade de BRS. De acordo com essa teoria, a BRS usa o hidrogênio catódico através do consumo da enzima hidrogenase para reduzir SO_4^{2-} (JAVAHERDASHTI, 2010). A seguir, são mostradas as reações presentes no mecanismo de despolarização catódica:

Reação Anódica: $4Fe \rightarrow 4Fe^{2+} + 8e^-$ (1)

Reação Catódica (Eletrólito): $8H_2O \rightarrow 8\ H^+ + 8\ OH^-$ (2)

Reação Catódica (Solução): $8H^+ + 8e^- \rightarrow 8H_{ad}$ (3)

Despolarização microbiana (microrganismo): $SO_4^{2-} + 8H_{ad} \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$ (4)

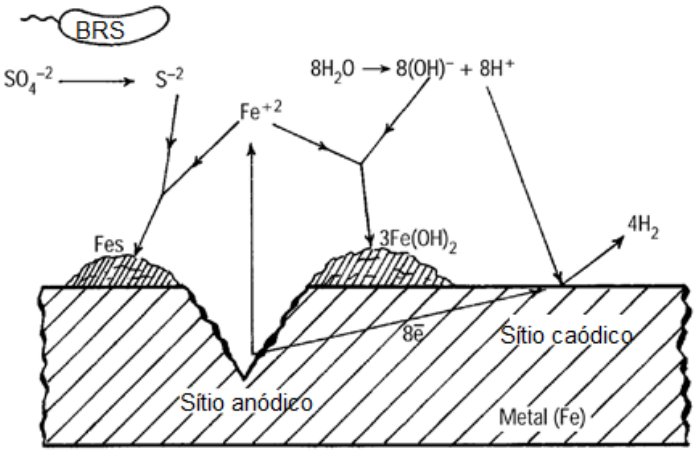
Produtos de Corrosão: $Fe^{2+} + S^{2-} \rightarrow FeS$ (5)

Produto de Corrosão: $3Fe^{2+} + 6OH^- \rightarrow 3Fe\ (OH)_2$ (6)

Reação Global: $4Fe + SO_4^{2-} + 4H_2O \rightarrow FeS + 3Fe\ (OH)_2 + 2OH^-$ (7)

A Figura 5 mostra um esquema da teoria da despolarização catódica pela atividade de BRS de acordo com Javaherdashti (1999).

Figura 5 - Esquema da teoria de despolarização catódica



Fonte: Adaptado de JAVAHERDASHTI,1999

De acordo com a teoria da despolarização catódica, a biocorrosão é acelerada devido à atividade hidrogenásica das bactérias, que despolarizam o catodo, acelerando indiretamente a reação anódica da dissolução do ferro (VIDELA, 2003). Assim, como produtos de corrosão teríamos o FeS e $Fe(OH)_2$. As BRS catalisam a recombinação do hidrogênio atômico adsorvido em gás hidrogênio (H_2), utilizando o hidrogênio adsorvido na redução de SO_4^{2-}. Assim, a reação de corrosão seria indiretamente acelerada pela despolarização da reação catódica (LV; DU, 2018).

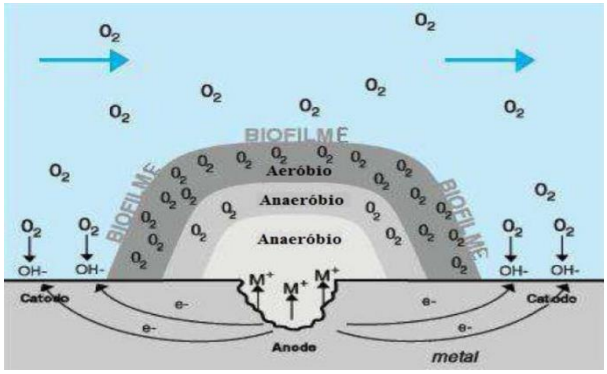
A teoria da despolarização catódica é bastante questionada atualmente por não levar em consideração o efeito corrosivo dos produtos da corrosão, como os óxidos, sulfetos, hidróxidos, e até mesmo dos biofilmes. Além disso, essa teoria exclui a participação de outros microrganismos envolvidos na biocorrosão, considerando apenas as espécies que possuem a enzima hidrogenase (VIDELA; HERRERA, 2005). E ainda, de acordo com essa teoria, a proporção de ferro corroído transformado em sulfeto de ferro (Fe/FeS) é de 4:1, porém, na prática, é observada uma proporção que varia entre 0,9:1 e 1:1 (JAVAHERDASHTI, 2011).

1.4.2 Formação de células de aeração diferencial

A corrosão localizada pode ser induzida por depósitos bióticos e abióticos em uma superfície metálica, originando assim, regiões diferentemente aeradas que

podem gerar uma célula de aeração diferencial ou de concentração de oxigênio. Dessa maneira, a área sob depósito, ou seja, menos oxigenada atuará como ânodo e a área descoberta atuará como catodo (VIDELA, 2003). Esse mecanismo é ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Biocorrosão por aeração diferencial



Fonte: Borenstein, 1994.

Como pode ser observado na Figura 3, devido ao consumo de oxigênio pela respiração aeróbica, uma região anaeróbica é originada sob a colônia de micro-organismos, desenvolvendo assim um tubérculo na área anódica, no qual se observa a formação de pites. Conforme há o crescimento dos pites, ocorrem reações catódicas com a formação de íons hidroxila, e reações anódicas com a formação de íons metálicos, dependendo da composição da superfície do material (GONÇALVES, 2002).

Sendo assim, qualquer material metálico ou liga submersa que seja recoberto com um biofilme de maneira não uniforme pode criar células de aeração diferencial por estar exposto a regiões aeradas (VIDELA, 2003).

1.4.3 Produção de metabólitos corrosivos

A produção de metabólitos ácidos, sejam orgânicos ou inorgânicos, é capaz de acelerar o processo corrosivo. O H_2S produzido pelo metabolismo das BRS pode

destruir a camada de passivação na superfície metálica, acelerando a corrosão. (GALVÃO, 2008).

Os fungos são conhecidos por produzirem grandes quantidades de ácidos orgânicos durante o seu crescimento (JIA et al., 2019). Eles são responsáveis pela biodeterioração de monumentos, outras relíquias culturais (SADIKI et al., 2015) e por danos causados a revestimentos de dutos enterrados, favorecendo a penetração, com consequente adsorção ao metal, de outros microrganismos, acelerando o processo corrosivo (GONÇALVES, 2002).

As algas também podem induzir mudanças nas superfícies metálicas em termos de oxigênio dissolvido e pH, acelerando o processo corrosivo (LANDOULSI et al., 2011). A atividade das algas no biofilme gera oxigênio, favorecendo assim a produção de substâncias poliméricas extracelulares pelas bactérias, o que cria uma condição propícia de anaerobiose para as atividades das BRS, o que colabora com o processo corrosivo (GALVÃO, 2008).

Qualquer microrganismo capaz de destruir as camadas de passivação mineral em superfícies metálicas pode contribuir para a corrosão. Os danos causados por biofilmes nas camadas de passivação são muito importantes e merecem bastante atenção nas investigações da CMI (JIA et al., 2019).

1.5 Uso de biocidas no controle da biocorrosão

Existem diversos métodos que viabilizam a identificação e o monitoramento da corrosão. Porém, é muito importante que o processo corrosivo seja evitado. Para isso, pode-se fazer uso de biocidas com ação nas células planctônicas, presentes no fluido de processo, ou sésseis, que ficam aderidas à superfície do material. Pode-se também fazer uso de alternativas que protejam a superfície metálica, como a aplicação de inibidores de corrosão, revestimentos, proteção catódica e anódica (FERREIRA, 2018).

Biocidas consistem em compostos ou mistura de compostos que são capazes de matar os microrganismos ou inibir o crescimento microbiano. A utilização de biocidas é o tratamento químico empregado no controle ou na prevenção de CMI em sistemas de águas industriais (VIDELA, 2003).

Esses produtos podem ser classificados como bacteriostáticos (inibem a síntese proteica e na sua ausência, os microrganismos voltam a ter atividade), bactericidas (provocam a morte celular, porém não destroem a célula mantendo a contagem celular constante e diminuindo o número de células viáveis) e bacteriolíticos (atuam na célula liberando o conteúdo citoplasmático através da lise da membrana) de acordo com a sua toxicidade seletiva (MADIGAN et al.,2010).

Os biocidas atuam atacando os componentes celulares funcionais colocando os microrganismos em estresse. A parede celular, os componentes da membrana citoplasmática e o citoplasma são os alvos preferenciais dos biocidas. Sendo assim, para serem eficazes, os biocidas precisam atravessar a membrana exterior das células microbianas e atingir os sítios alvos com uma concentração mínima ativa. Esse acesso aos sítios alvos depende da composição química e das propriedades físico-químicas de cada biocida (PAULUS, 1993; RUSSEL 1995).

Sendo assim, a eficácia do biocida vai depender da natureza dos microrganismos que se deseja eliminar, das condições de operação do sistema no qual o biocida precisa ser compatível, da concentração do biocida, do tempo de contato e do pH (VIDELA, 2003). É importante que o tempo de contato seja bem definido já que muitos microrganismos não são eliminados por contato imediato com a maioria dos biocidas utilizados e, em alguns casos, podem induzir a resistência das bactérias causadoras de CMI (ARAÚJO et al., 2013).

Outros requisitos importantes na seleção de um biocida incluem: não ser corrosivo para os metais do sistema; apresentar boa biodegradabilidade; ter a capacidade de manter o efeito inibidor diante de outras substâncias presentes no meio em condições semelhantes às de operação; ter baixo custo e ser seguro para o manuseio durante a utilização e a dosagem (VIDELA, 2003).

Os biocidas utilizados no tratamento de águas industriais a fim de controlar o crescimento de microrganismos podem ser divididos em oxidantes e não oxidantes. Dentro do primeiro grupo podem ser citados o cloro, bromo, ozônio e o peróxido de hidrogênio. Entre os não oxidantes, tem-se o glutaraldeído, os compostos de amônio quaternário e as isotiazolinas e o sulfato de tetrakis (hidroximetil)fosfônico (THPS).

Os biocidas comercialmente utilizados e citados anteriormente são eficazes no controle da biocorrosão, porém, a maioria é tóxico e possui difícil degradação levando a sua utilização impactar negativamente o meio ambiente (SILVA, 2015).

O uso desses biocidas tóxicos é um problema para a indústria de sistemas de *sprinklers*. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (The Environmental Protection Agency – EPA) define biocida como sendo um grupo diversificado de substâncias venenosas, incluindo conservantes, inseticidas, desinfetantes e pesticidas, usados para o controle de organismos que são prejudiciais à saúde humana ou animal ou causam danos a produtos naturais ou manufaturados (CHARTIER, 2004).

A preocupação com relação ao uso de biocidas nas indústrias de *sprinklers*, além dos danos ao meio ambiente, se deve ao fato de, em caso de um incêndio e da necessidade de um chuveiro automático ser acionado em um lugar que estiver lotado de pessoas, o biocida será lançado juntamente com a água, sendo inalado pelo público presente no local, expondo todos aos riscos. Por esse motivo, a indústria de *sprinklers* considera o risco do uso de biocidas, diferentemente das outras indústrias (CHARTIER, 2004).

Tendo em vista a alta toxicidade dos biocidas comercializados, a busca por biocidas alternativos naturais tem sido frequente. Na Tabela 1 são apresentados alguns estudos realizados com biocidas, sendo eles naturais ou não, que mostram a variedade de compostos usados no controle de diferentes grupos microbianos envolvidos na CIM em diferentes meios. Para a eficácia do tratamento, é necessário um estudo prévio da concentração de biocida a ser usada além do tempo de contato com o sistema que podem variar dependendo do microrganismo a ser tratado e do meio corrosivo.

Tabela 1 - Estudos realizados com biocidas, naturais ou não, encontrados na literatura (continua)

Microrganismo/Material	Biocida	Observações	Referências
BRS/Aço Carbono	Compostos de amônio Quaternários (QUATS)	- A concentração de biocida testada variou entre $1x10^{-5}$ e $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Os compostos hidróxidos de decil, dodecil e hexa decil dimetil isopropil amônio inibiram, tanto a corrosão em aço carbono em HCl 1 mol L^{-1}, como também o crescimento de BRS.	Badawi et al. (2010)
Desulfovibrio vulgaris e *Desulfovibrio giga*/Aço carbono	Sulfato de tetraquishidroximetil fosfônio (THPS)	- A concentração de 100 mg L^{-1} de biocida apresentou boa eficiência no controle de biofilmes de BRS no metal utilizando como meio uma mistura de água e óleo. - Houve uma redução de 3 ordens de grandeza para células planctônicas e sésseis.	Lavania et al. (2011)
Cultura mista contendo BRS/Aço carbono	Óleo de Alho/ Glutaraldeído	- A concentração de 3% m/v de óleo de alho apresentou uma redução das células sésseis em 30% em água do mar sintética, para o tempo de crescimento do microrganismo de 7 dias. - A concentração de 100 ppm de glutaraldeído inibiu completamente o crescimento de células sésseis nas mesmas condições.	Silva (2015)
Arthrobacter sulfureus/ Cobre (95-97% pureza)	Extrato de folhas de nim	- [extrato de nim] = 3% (v/v) inibe o crescimento das bactérias em meio de água destilada. - O efeito bactericida do filme formado pelo extrato da folha de nim no cupom permaneceu estável por até 3 semanas. -Os resultados de polarização potenciodinâmica e os estudos EIE estão de acordo com a natureza dos filmes observados na análise SEM.	(SWAROOP, VICTORIA, MANIVANNAN, 2016)

Tabela 1 - Estudos realizados com biocidas, naturais ou não, encontrados na literatura (conclusão)

Microrganismo	Biocida	Conclusões	Referências
Bacillus thuringiensis EN2 strain/Aço doce 1010	Extrato de gengibre	- A concentração de 20 ppm foi a dosagem ideal para a inibição da formação de biofilme na superfície do material em água de resfriamento. Inibição de 80% da corrosão.	Narenkumar et al. (2017)
Desulsufovibrio alaskensis /Aço Carbono	Óleo de nim	- A concentração de 4% v/v inibiu o crescimento microbiano em 72% na superfície do metal em água de mar sintética por 7 dias. Além disso, as bactérias cultivadas no meio contendo óleo de nim formaram um biofilme que cobriu grande parte da superfície do corpo de prova, gerando assim uma resistência à transferência de carga maior e diminuição do processo corrosivo.	Fonseca (2018)
Pseudomonas aeruginosa, *Shewanella* sp. e BRS/Aço carbono	Proantocianidinas extraídas da fibra do coco verde (*Cocos nucifera* L.)	- A concentração de biocida inibitória mínima foi de 2 g L^{-1} para *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella* sp. e de 3 g L^{-1} para as BRS em água sintética de sistema de refrigeração. - No meio de estudo (água sintética de sistema de regrigeração) e pH neutro, em concentrações superiores a 0,5 g L^{-1} de biocida, a eficiência de inibição da corrosão foi superior a 70%.	GUEDES, 2018

Fonte: O autor, 2020.

Como pode ser observado na tabela 1, os biocidas podem apresentar efeitos diferentes dependendo do tipo de microrganismo para o qual o tratamento está sendo aplicado, bem como a concentração e o tempo de contato que é utilizado. As BRS possuem diversas espécies que podem reagir de diferentes formas à ação dos biocidas em uma mesma concentração e tempo de contato.

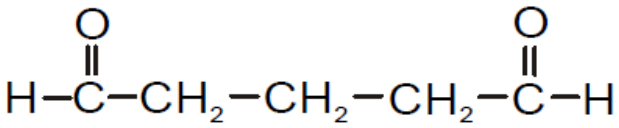
O extrato de nim, que é um biocida natural apresentou resultados promissores nos estudos citados na tabela 1. Swaroop, Victoria e Manivannan (2016) demonstraram que a concentração de 3% (v/v) de extrato de nim inibiu o crescimento das bactérias em meio de água destilada e Fonseca (2018) concluiu que a concentração de 4% v/v inibiu o crescimento microbiano em 72% na superfície do metal em água de mar sintética por 7 dias.

Portanto, no presente estudo, o óleo de nim foi escolhido como uma possível alternativa para o tratamento de águas utilizadas em sistemas de *sprinklers*. Para fins de comparação, também foi avaliado o glutaraldeído, que é um biocida comercialmente utilizado. Ambos são descritos a seguir:

1.5.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um ingrediente ativo de uma grande variedade de biocidas comerciais empregados no controle de fungos, algas, bactérias como as bactérias redutoras de sulfato e biofilmes bacterianos. Este composto atua em amplos intervalos de pH e de temperatura (VIDELA, 2003). A fórmula estrutural do glutaraldeído é mostrada na Figura 7.

Figura 7 - Fórmula estrutural do glutaraldeído



O glutaraldeído possui ação biocida no qual o mecanismo está associado a uma ligação cruzada (interação do biocida com a célula por ligações covalentes) com as camadas proteicas externas da célula, afetando a permeabilidade celular e

impedindo o transporte de nutrientes para a célula e remoção de produtos residuais, resultando assim na morte celular (GONÇALVES, 2002).

A interação do glutaraldeído com os constituintes celulares é favorecida pelo aumento do pH. Outros fatores podem influenciar o desempenho deste biocida, tais como o tempo de contato, a concentração e a temperatura. (EAGAR et al., 1986).

1.5.2 Óleo de nim

Atualmente, os biocidas naturais de origem vegetal são de grande interesse por serem baratos, prontamente disponíveis e ambientalmente seguros. Diversos biocidas ambientalmente amigáveis têm sido estudados no controle da biocorrosão (SWAROOP; VICTORIA; MANIVANNAN, 2016).

O nim (*Azadirachta indica)* é popularmente conhecido como amargosa. É um vegetal da família das *Meliaceae.* É nativo da Índia e da Birmânia, porém desenvolve-se bem em regiões semiáridas.

O uso mais antigo do nim é o medicinal. No Brasil, a introdução do nim se deu pelo Instituto Agronômico do Paraná, no ano de 1996. Hoje a árvore do nim já é encontrada em todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões mais quentes (NEVES; CARPANEZZI, 2009; MARTINEZ, 2011). A Tabela 2 mostra a composição química do óleo de nim.

Tabela 2 - Composição do óleo de nim (continua)

Composto	**%**
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

Fonte: Kurose, 2005

Tabela 3 - Composição do óleo de nim (conclusão)

Composto	%
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-linolenoato	1,02
Tricosano	10,08
Metil-palmitato	1,34

Fonte: KUROSE, 2005

Com relação a sua efetividade na corrosão, um estudo em cobre realizado com o extrato das folhas de nim em água destilada, contendo uma cultura de *Arthrobacter sulfureus,* mostrou que uma concentração de 3% v/v é suficiente para diminuir o crescimento microbiano (SWAROOP; VICTORIA; MANIVANNAN, 2016). Já em meios contendo BRS, um estudo que investigou o efeito de inibição de CMI do extrato de nim em tubulação de aço API 5L X80 mostrou que o extrato das folhas de nim diminuiu a taxa de corrosão em 50% em água do mar artificial em uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato contendo *Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrio alaskensis* e *Desulfomicrobium aspheronum* (BHOLA et al., 2014). Fonseca, 2018 avaliou o efeito do óleo de nim no crescimento microbiano de uma cultura de *Desulsufovibrio alaskensis* em aço carbono em meio de água do mar sintética concluindo que a concentração de 4% v/v inibiu o crescimento microbiano em 72% na superfície do material estudado para o tempo de 7 dias.

1.6 Monitoramento da biocorrosão

Um conhecimento multidisciplinar é essencial para uma boa interpretação de qualquer caso de corrosão microbiológica e deve ser feita uma análise completa do processo com metodologias microbiológicas e eletroquímicas bem definidas (VIDELA; HERRERA, 2005).

Muitos métodos têm sido usados na avaliação e no monitoramento da biocorrosão incluindo métodos eletroquímicos, microbiológicos, microscópicos, físico-químicos, dentre outros (PAULA, 2010). Esses métodos serão descritos a seguir.

1.6.1 Métodos microbiológicos

Os métodos microbiológicos têm sido utilizados para o isolamento, cultivo, identificação e quantificação de microrganismos (JIA et al., 2019).

É importante identificar e quantificar os microrganismos causadores da corrosão. A população de organismos presentes na fase aquosa (planctônicas) é capaz de induzir a corrosão generalizada por produção de metabólitos corrosivos ou pelo consumo de inibidores da corrosão. Já os organismos aderidos à superfície (sésseis) produzem corrosão localizada, que é mais severa. A contagem de microrganismos pode ser feita por técnicas tradicionais de crescimento em meios de cultura gerais ou seletivos, sendo a técnica *pour plate* em placas de Petri normalmente utilizada para bactérias aeróbias e fungos. O método do número mais provável (NMP) é empregado no caso de bactérias anaeróbias, incluindo as BRS (VIDELA, 2003). Este método consiste em realizar sucessivas diluições do inóculo e em seguida incubar as amostras por 28 dias, no caso de bactérias anaeróbicas. Ao final do tempo de incubação, o crescimento celular é verificado através da turvação do meio e essas amostras são consideradas positivas. Os resultados positivos e negativos são combinados para estimar o número mais provável de microrganismos viáveis na amostra e essa estimativa é feita com base em tabelas estatísticas e na teoria da probabilidade (HARRIS; JONES; LEWIS, 1998; SUTTON, 2010).

No caso da BRS, sua presença é verificada pela formação de um precipitado preto de sulfeto ferroso (FeS).

1.6.2 Métodos físico-químicos

É muito importante determinar se as condições ambientais são adequadas para microrganismos diante de um problema de biocorrosão. Dentre as análises estão a verificação da temperatura, pH, presença de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes essenciais, níveis de íons específicos para o crescimento e metabolismo de microrganismos, como o sulfato, no caso da presença de BRS (VIDELA, 2003).

1.6.3 Métodos de avaliação qualitativa e semi-quantitativa da CMI

Técnicas de microscopia são muito utilizadas na avaliação da corrosão. Elas fornecem informações sobre a morfologia das células microbianas e colônias, sua distribuição na superfície, a presença de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), a natureza dos produtos de corrosão (cristalinos ou amorfos) e também podem identificar o tipo de ataque ao metal (corrosão por pites ou uniforme). Além disso, permite uma visualização das mudanças nas características da microestrutura e da superfície após remoção dos produtos de biofilme e corrosão (BEECH; GAYLARDE, 1999). As técnicas microscópicas mais utilizadas na investigação da biocorrosão são a microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA), microscopia confocal por varredura a laser (MCVL) e microscopia de força atômica (MFA)(BEECH, 2004).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método básico na avaliação de morfologias de biofilme e produtos de corrosão (LIU et al., 2018). Este método fornece imagens de alta resolução, sendo possível observar diferentes formas de células em um consórcio de biofilme de cultura mista (JIA et al., 2017).

Porém, somente a detecção de microrganismos não deve ser a única base para confirmar seu envolvimento no processo corrosivo, sendo necessária a

identificação de atividades microbianas específicas no local onde a corrosão está (BEECH; GAYLARDE, 1999).

A análise química de superfície permite a determinação da composição química dos produtos de corrosão e depósitos microbiológicos, fornecendo informações sobre as reações eletroquímicas envolvidas no processo de corrosão do metal (BEECH, 2004). As técnicas normalmente empregadas, visando obter informações sobre os produtos de corrosão nas superfícies metálicas, são a espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e difração de raios X (DRX) (MARQUIS, 1989).

O DRX não possui alta resolução espacial para detectar corrosão localizada. Os raios X são ondas eletromagnéticas de comprimento de onda na região de 0,1 a 10 Å, o que os permite sondar a estrutura do material ao nível de distâncias interatômicas, o que faz essa técnica eficiente na análise qualitativa da estrutura das superfícies, permitindo a identificação dos produtos de corrosão formados. Já o EDS avalia a abundância elementar em alta resolução sobre uma profundidade de amostragem de aproximadamente 1m (BEECH, 2004). Com a análise de EDS é possível a obtenção de uma análise elementar semiquantitativa do produto de corrosão formado na superfície metálica. Além disso, a técnica de EDS pode ser aplicada a um microscópio eletrônico de varredura, permitindo a observação e a determinação semiquantitativa dos produtos de corrosão em locais selecionados na superfície. As duas técnicas possuem a vantagem da preparação da superfície ser simples e não causar prejuízo ao produto formado (PAULA, 2010).

1.6.4 Métodos eletroquímicos

Por natureza, a biocorrosão é um processo eletroquímico, apesar da participação dos microrganismos ser ativa no fenômeno (VIDELA, 2003). Sendo assim, os métodos eletroquímicos podem ser usados não somente para estudar o comportamento da CMI, como também avaliar a eficácia dos biocidas (JIA et al., 2019). A utilização de técnicas eletroquímicas deve ser analisada com muito cuidado e ser complementada com um estudo simultâneo dos aspectos microbiológicos e metalográficos que intervêm no processo (VIDELA, 2003).

Serão descritas a seguir as técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e polarização potenciodinâmica, que são as que foram usadas no presente estudo.

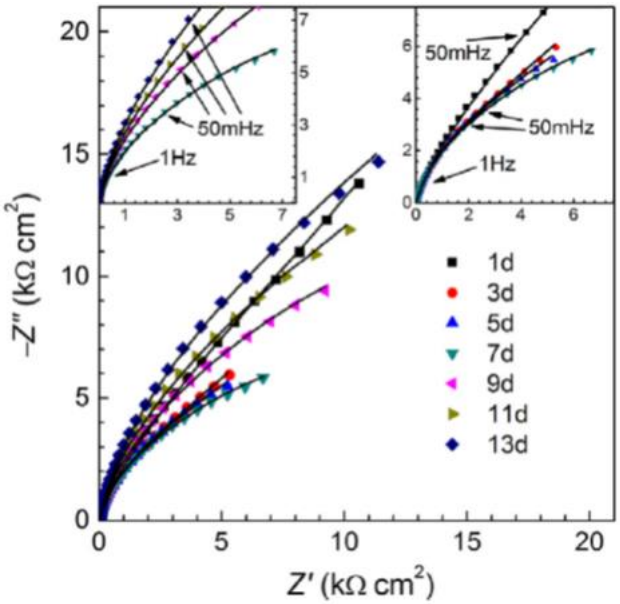
1.6.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de EIE é uma técnica não destrutiva utilizada no estudo da biocorrosão. Nesta técnica, é aplicado um potencial de corrente alternada com uma perturbação de 5 a 10 mV de amplitude em uma faixa de frequência muito grande, normalmente de 10^5 a 10^{-3} Hz (JIA et al., 2019). Como resposta ao sistema, é possível a obtenção de informações importantes sobre a cinética de transferência de carga e sobre a estrutura e as propriedades da interface eletrodo/eletrólito (GNEDENKOV; SINEBRYUKHOV; SERGIENKO, 2005).

A aplicação de corrente alternada à célula eletroquímica é feita através de um potenciostato acoplado a um computador. A corrente alternada, com uma dada frequência, é programada pelo computador e aplicada no eletrodo de trabalho pelo potenciostato. A resposta do eletrodo é recebida pelo detector de frequência, que encaminha os dados ao computador para processamento (WOLYNEC, 2003).

As respostas eletroquímicas da EIE são utilizadas para a construção dos gráficos de Nyquist, Bode e Fase. No diagrama de Nyquist, os valores da impedância real (Z') e da impedância imaginária (-Z") são representados em um plano complexo. A impedância real (Z') incorpora as resistências ôhmicas, isto é, a resistência pura, que independe da frequência. Já a impedância imaginária (Z") incorpora as reatâncias, ou seja, a resistência que é dependente da frequência aplicada ao sistema. Os pontos correspondentes aos baixos valores de frequência se posicionam ao lado direito do diagrama. A medida que a frequência aumenta, os pontos se deslocam para a esquerda, passando pelo ponto de frequência máxima ($f_{máx}$) (WOLYNEC, 2003; SILVA, 2013). Um diâmetro de semicírculo maior em um diagrama de Nyquist significa maior resistência à corrosão (JIA et al., 2019). A Figura 8 apresenta um exemplo do diagrama de Nyquist para um processo de corrosão de cobre na presença de BRS.

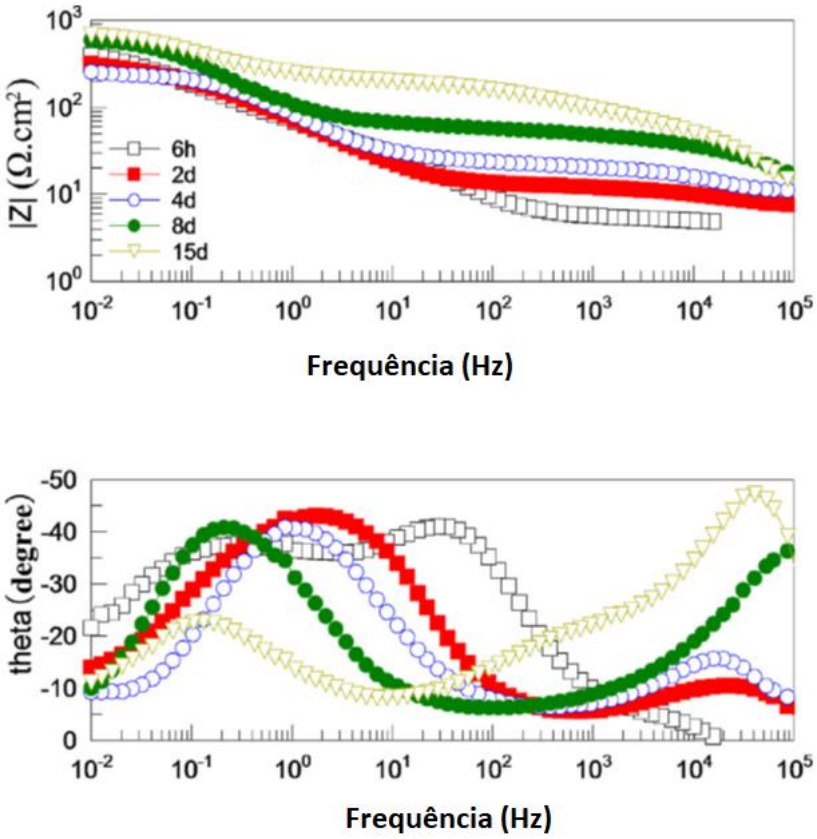
Figura 8 - Exemplo de Diagrama de Nyquist para um processo de corrosão de cobre na presença de BRS



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2014.

Os diagramas de Bode (Módulo e Fase) exibem as variações da impedância em altas frequências, geralmente omitidas no diagrama de Nyquist. No diagrama de Bode, são apresentados os valores do módulo de impedância (|Z|) em função dos valores de frequência, ambos em escala logarítmica, e no diagrama de fase são representados os valores de ângulo de fase em função da frequência em escala logarítmica (SILVA, 2015 apud CANO; LAFUENTE; BASTIDAS, 2009; WOLYNEC, 2003). Na Figura 9 são apresentados exemplos de diagramas de Bode (Módulo e Fase) para um processo corrosivo de aço carbono em água utilizada em torre de resfriamento.

Figura 9 - Exemplos de diagramas de Bode (Módulo e Fase) para um processo corrosivo de aço carbono em água utilizada em torre de resfriamento



Fonte: Adaptado de SU et al., 2014.

Os dados da EIE são modelados utilizando modelos de circuitos elétricos equivalentes, que consistem em um resistor, um capacitor (ou elemento de fase constante), impedância de Warburg e outros componentes. Os circuitos equivalentes reproduzem as propriedades elétricas do sistema, baseado em um possível modelo físico, onde cada elemento representa e caracteriza as propriedades eletroquímicas do processo (GNEDENKOV; SINEBRYUKHOV; SERGIENKO, 2005). Caso os circuitos equivalentes estejam em série, as somas das resistências resistência da solução fornecem a resistência à corrosão (JIA et al., 2017).

1.6.4.2 Polarização potenciodinâmica

É importante conhecer o comportamento eletroquímico de um metal em um potencial de eletrodo diferente do potencial de corrosão (ou de equilíbrio), tanto do ponto de vista prático, quanto teórico (WOLYNEC, 2003).

A polarização de um metal trata-se do afastamento do potencial de corrosão (Ecorr) ou potencial de circuito aberto, provocado pela passagem de corrente por uma célula eletroquímica. Na polarização potenciodinâmica, é empregada uma tensão DC na faixa de várias centenas de mV em torno do potencial de circuito aberto estável a fim de avaliar o comportamento da corrosão em um sistema. Com a aplicação dessa metodologia são obtidas as curvas de polarização, que relacionam o potencial e a corrente (i) ou a densidade de corrente (I) (corrente dividida pela área do material que é exposta às reações eletroquímicas). As inclinações de Tafel da curva anódica e catódica produzem valores de βa e βc (PAULA, 2010; R. JIA, 2019). Nos ensaios de polarização, é possível a obtenção de condições similares do metal exposto àquelas em que ele se encontra no ambiente natural (atmosfera, indústria, etc), quando o afastamento do Ecorr causa mudanças consideráveis em sua superfície (PAULA, 2010).

O potencial de corrosão é o potencial característico de um metal que sofre corrosão numa solução de baixa resistividade elétrica. Esse potencial é obtido pela interseção da curva de polarização anódica com a curva de polarização catódica (WOLYNEC, 2003).

As curvas são obtidas através de um potenciostato que é um equipamento eletrônico capaz de impor ao eletrodo de trabalho o potencial de eletrodo desejado, atuando sobre uma célula eletroquímica com três eletrodos (um eletrodo de trabalho, que se trata do eletrodo de estudo, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo). A curva de polarização obtida dessa forma não representa a polarização de uma única reação, mas do efeito global de todas as reações que ocorrem simultaneamente sobre o eletrodo (WOLYNEC, 2003; GENTIL, 2007).

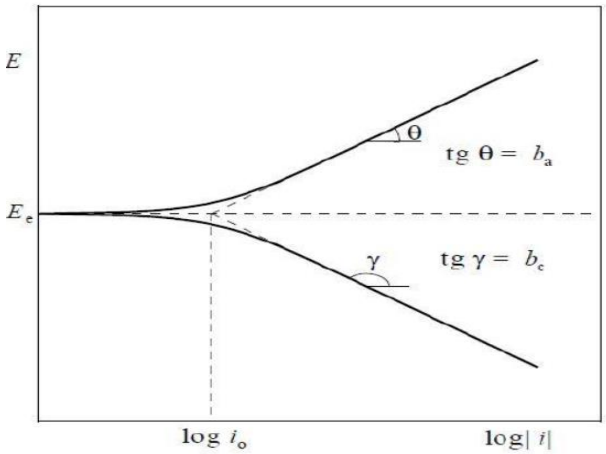
Experimentalmente, existem dois métodos convencionais para a obtenção de uma curva de polarização: o método potenciostático e o método potenciocinético ou potenciodinâmico. No primeiro método, são aplicados valores discretos,

crescentes ou decrescentes ao potencial de eletrodo, e, em cada potencial, a variação de corrente correspondente é determinada. No segundo método, varia-se continuamente o potencial de eletrodo, registrando a variação de corrente que também varia de maneira contínua (WOLYNEC, 2003).

Uma maneira de apresentar as curvas de polarização é pela relação entre a sobretensão de um eletrodo e a densidade de corrente correspondente, estabelecida experimentalmente por Tafel.

Devido à natureza logarítmica da equação de Tafel, uma maneira apropriada de se apresentar as curvas de polarização é através de um diagrama potencial contra a densidade de corrente em escala logarítmica (E vs log(i)). Este tipo de diagrama tem a vantagem de que parte das curvas em que a equação de Tafel é válida apresenta-se como uma reta (WOLYNEC, 2003). A apresentação de uma curva de polarização é mostrada na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática das curvas de polarização em um diagrama logarítmico. E = potencial de eletrodo; Ee = potencial de equilíbrio; Θ = inclinação da reta anódica, γ - inclinação da reta catódica; i - densidade de corrente; βa e βc – constante



Fonte: WOLYNEC, 2003.

De acordo com a variação do potencial de eletrodo aplicado, o valor da sobretensão descreve o comportamento do metal. Para valores de sobretensão positivos, a corrente que passa pela interface metal/eletrólito é positiva (corrente anódica) e o metal sofrerá corrosão através de uma reação de oxidação. Caso a

sobretensão apresente valores negativos, será estabelecida uma corrente negativa, ou seja, catódica, levando a uma reação de redução (GENTIL, 2011).

É importante ressaltar, que o ensaio de polarização potenciodinâmica pode causar danos significativos aos biofilmes. Por esse motivo, deve ser usado com cautela. A varredura deve ser feita apenas uma vez no final de um experimento, após o qual o eletrodo de trabalho deve ser descontinuado de outras incubações e testes (JIA et al., 2019).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Corpos de prova

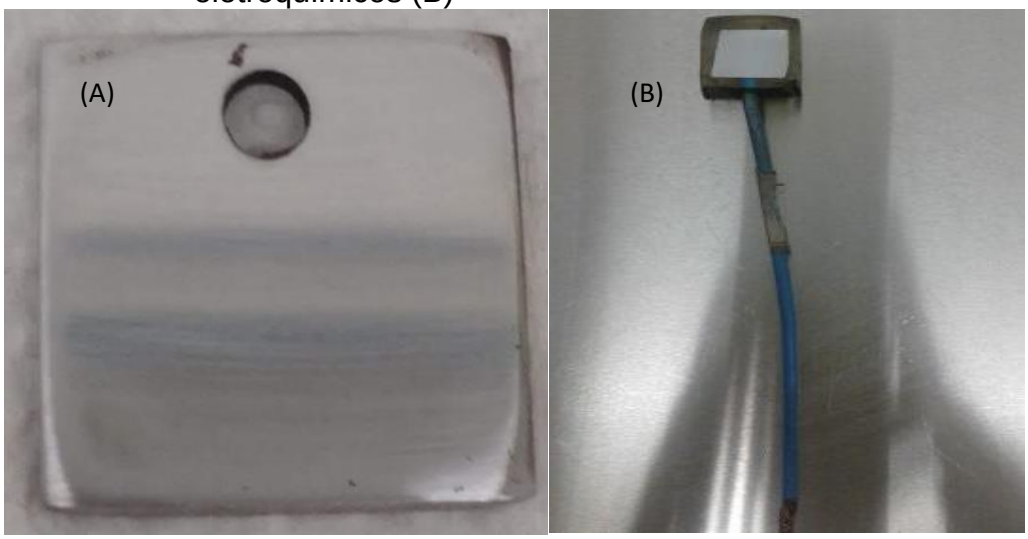
Foram utilizados para todos os ensaios cupons metálicos de aço carbono AISI 1020 cuja composição química em % massa é descrita na Tabela 3. Foram utilizados dois corpos de prova diferentes como mostrado na Figura 11. O corpo de prova da Figura 11 A foi usado nos ensaios de quantificação celular e de avaliação morfológica, enquanto aquele apresentado na Figura 11 B foi utilizado nos ensaios eletroquímicos.

Tabela 4 - Composição química em % massa do aço carbono AISI 1020

Elemento	% massa
C	0,16
Mn	0,63
P	0,012
$S_{máx}$	0,031
Si	0,012
Cu	0,01
Cr	0,03
Ni	0,01
Fe	99,105

Fonte: INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS, 2017.

Figura 11 - Corpos de prova utilizados nos ensaios de quantificação celular e avaliação morfológica (A) e ensaios eletroquímicos (B)



Fonte: O autor, 2020.

Para os ensaios de quantificação celular e avaliação morfológica (Figura 11A) os corpos de prova utilizados tinham dimensões em torno de 2.0 x 1,8 x 0,1 cm e área média em torno de 8 cm^2.

Estes cupons 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. Após essa etapa, foram mantidos em dessecador até a imersão no meio de cultura.

Para os ensaios eletroquímicos foram utilizados cupons com dimensões em torno de 1,8 x 1,7 x 0,1 cm e área média exposta de aproximadamente 3 cm^2 (Figura 11B). A fim de proporcionar a conexão elétrica do sistema, um fio condutor de cobre foi soldado em cada cupom metálico. Posteriormente, os mesmos foram embutidos em resina epóxi de modo que apenas uma de suas faces ficasse exposta ao meio corrosivo. O processo de lixamento e limpeza destes corpos de prova foi o mesmo usado para os ensaios de quantificação celular.

2.2 Fluido de processo e preparo do inóculo

A água utilizada para isolar as bactérias, no preparo dos meios de cultura e na realização dos ensaios eletroquímicos (eletrólito) é mostrada na Figura 12 e foi cedida por uma indústria farmacêutica localizada no Rio de Janeiro. A água foi retirada diretamente da rede de *sprinkler* da empresa.

Figura 12 - Água utilizada para isolar a cultura de bactérias utilizada no trabalho e para a realização de todos os ensaios

Fonte: O autor, 2020.

Pode ser observada uma forte coloração marrom na amostra que é proveniente da quantidade de sólidos dissolvidos.

A determinação das características da água utilizada na presente dissertação foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Química Ambiental. Foram determinados o pH, a condutividade, o teor de sulfato, e carbono orgânico, inorgânico e total da amostra.

A determinação da concentração de sulfato foi realizada pelo método turbidimétrico. O princípio deste método é que o íon sulfato (SO_4^{2-}) é precipitado em meio de ácido acético com cloreto de bário ($BaCl_2$), na forma de cristais de tamanho uniforme de sulfato de bário ($BaSO_4$). A absorbância de

luz da suspensão de sulfato de bário é medida espectrofotômetricamente, e a concentração de SO_4^{2-} é determinada pela comparação das leituras com a curva padrão. Sendo assim, para a determinação da concentração de sulfato na amostra de água utilizada, foram preparadas soluções padrão com várias concentrações de SO_4^{2-} para a construção da curva padrão de absorbância x mg/mL de SO_4^{2-}. Também foi preparada uma solução tampão, no qual foram dissolvidos 30,0 gramas de cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$), 5,0 gramas de acetato de sódio ($CH_3COONa.3H_2O$), 1,0 grama de nitrato de potássio (KNO_3), 0,111 gramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e 20 mL de ácido acético (CH_3COOH 99%) em 1000 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 100 mL da água a ser analisada em um erlenmeyer de 250 mL e 20 mL da solução tampão. Após, foi adicionado aproximadamente 1,16g de cloreto de bário. A solução foi agitada por 60 segundos. Este tratamento foi efetuado tanto para a amostra a ser analisada, quanto para todas as concentrações utilizadas na curva padrão. Após, a turbidez da amostra foi medida em espectrofotômetro e a concentração de SO_4^{2-} foi calculada pela comparação da turbidez lida com a curva de calibração. Após o procedimento, a concentração de sulfato na amostra de água foi determinada pela equação 1.

$$mg\ SO_4^{2-}/_L = \frac{mg\ SO_4^{2-}\ X\ 1000}{mL\ de\ amostra} \qquad (1)$$

A avaliação da concentração de carbono foi realizada em um Analisador de Carbono da marca Shimadzu Corp (modelo TOC-L CSN) da seguinte maneira: Para a determinação de carbono total, uma alíquota da amostra analisada foi adicionada em um forno de combustão catalítica, onde todo o carbono presente (orgânico ou inorgânico) foi convertido em CO_2, sendo detectado e quantificado por infravermelho não dispersivo. O teor de carbono inorgânico foi obtido com uma nova alíquota retirada e acidificada com ácido clorídrico 2 mol L^{-1}. A acidificação provoca a conversão do carbono presente na forma inorgânica (CO_2 dissolvido, hidrogenocarbonatos e carbonatos) em CO_2 e, então, pode ser detectado e quantificado por infravermelho não dispersivo. O carbono orgânico total é determinado com a diminuição do carbono total com o carbono inorgânico.

A água de *sprinkler* foi armazenada sob refrigeração e também foi usada como fluido de processo em todos os ensaios realizados, sendo utilizada tanto para

o preparo dos meios de cultura, quanto para a realização dos ensaios eletroquímicos (eletrólito). Porém, em função da baixa condutividade da amostra original de água, a mesma foi filtrada e usada na presença de uma solução 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$, a fim de permitir o transporte das cargas durante os ensaios eletroquímicos.

A cultura bacteriana utilizada neste trabalho foi uma cultura mista contendo o grupo de bactérias conhecido como bactérias redutoras de sulfato (BRS). As bactérias foram isoladas da água da rede de *sprinkler* cedida de uma indústria farmacêutica localizada no Rio de Janeiro mencionada anteriormente. Para o isolamento da bactéria, uma alíquota da água de *sprinkler* (correspondente a 10% do volume do meio de cultura) foi inoculada em frascos de 50 e 100 mL contendo meio Postgate C modificado (POSTGATE, 1984), cuja composição é apresentada na Tabela 4. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a uma temperatura de 30° C. A presença das BRS na água foi evidenciada pela coloração preta, devido à formação de precipitado sulfeto de ferro.

Tabela 5 - Composição do Meio Postgate C

Composição	**Quantidade**
KH_2PO_4	0,50 g
NH_4Cl	1,00 g
Na_2SO_4	4,50 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,04 g
$MgSO_4.6H_2O$	0,06 g
Lactato de Sódio (50% p/v)	9,40 mL
Extrato de Levedura	1,00 g
Citrato de sódio $.7H_2O$	0,30 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,004 g
Ágar	1,90 g
Resazurina	4,00 mL
Água da torneira	1000 mL

Fonte: POSTGATE, 1984.

O meio foi preparado em condições de anaerobiose, sob purga de nitrogênio. O pH do meio foi ajustado para 7,6 com uma solução de NaOH 1 mol L^{-1}. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.3 Meios de cultura

Foi utilizado, para o cultivo das BRS, o meio de cultura Baar's modificado (adaptado de ATTC meio 1249), conforme mostrado na Tabela 5. O presente meio foi usado tanto para os ensaios bióticos (na presença de BRS), quanto para os ensaios abióticos (na ausência de BRS) e com biocidas.

Tabela 6 - Composição do meio Baar's modificado

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

Fonte: Adaptado de ATTC Meio 1249.

O meio foi preparado sob purga de nitrogênio para que as condições de anaerobiose fossem garantidas, já que as BRS são microrganismos anaeróbios. O pH do meio foi ajustado para 7,5 adicionando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1}. Após, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Além do meio Baar's modificado, foram preparados os meios de cultura Postgate E e solução de diluição para o ensaio de quantificação microbiana, cujas composições são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

A composição do meio Postgate E é mostrada na Tabela 6 e da solução de diluição, apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição do meio Postgate E modificado

Composição	Quantidade
K_2HPO_4	0,5g
NH_4Cl	1,0 g
Na_2SO_4	1,0 g
$CaCl_2.H_2O$	0,67 g
$MgCl_2.6H_2O$	1,83 g
Lactato de Sódio (50% m/v)	7,0 mL
Extrato de Levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,5g
Ágar	1,9 g
Solução de Resazurina (0,025% m/v)	4,0 mL
Água da Bica	1000 mL

Fonte: POSTGATE, 1984.

Tabela 8 - Composição da solução de diluição

Reagentes	Quantidade
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,100 g
Solução de Resazurina (0,025% m/v)	4 mL
Água da bica	1000 mL

Fonte: Adaptado de PENNA, 2004.

Ambos os meios foram preparados sob purga de nitrogênio e o pH foi ajustado para 7,60 com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol L^{-1}.

2.4 Sistemas utilizados para os ensaios eletroquímicos (abióticos e bióticos) e para os ensaios de quantificação microbiana

Para a realização de todos os ensaios, foram adicionados 80 mL do meio de cultura Baar's em frascos de 100 mL que foram denominados de biorreatores, como ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Biorreator contendo o meio de cultura Baar's modificado

Fonte: O autor, 2020.

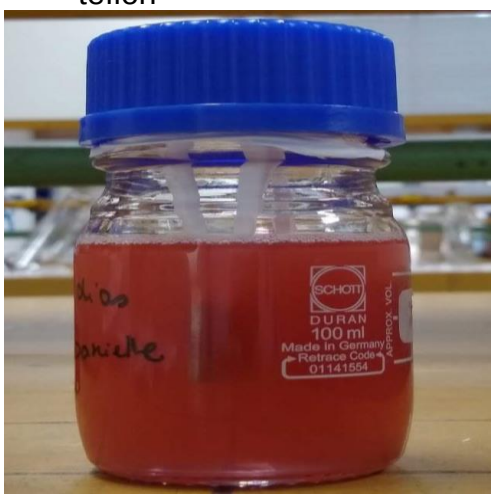
Para os ensaios bióticos, o meio de cultura foi inoculado a 10% v/v com a cultura mista de BRS. Para os ensaios com biocidas, antes da inoculação com a cultura de BRS, foi adicionada a quantidade desejada de biocida ao meio de cultura. Além disso, foi adicionada, nos biorreatores contendo o meio de cultura, no momento da introdução do corpo de prova, 2 mL de uma solução de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 0,5 g L^{-1} previamente filtrada em membrana Milipore de 0,45 µm de porosidade. Essa solução foi adicionada, tanto nos ensaios abióticos quanto nos bióticos, e nos ensaios com biocidas, a fim de fornecer ferro ao meio de cultura.

Os corpos de prova utilizados em todos os ensaios dessa dissertação foram esterilizados em fluxo laminar por 20 minutos, cada face, pela luz ultravioleta (UV), antes da imersão dos corpos de prova no meio de cultura. Para os ensaios de quantificação celular e avaliação morfológica, os cupons metálicos foram introduzidos no biorreator por meio de uma fita de teflon para que permanecessem suspensos durante o período de exposição, como mostrado na Figura 14. Os biorreatores contendo o corpo de prova para os ensaios eletroquímicos foram preparados como demonstrado na Figura 15. Durante a imersão dos corpos de

prova para ambos os ensaios, os biorreatores foram purgados com gás nitrogênio, garantindo assim uma baixa concentração de oxigênio dissolvido.

A quantificação celular e os ensaios eletroquímicos foram realizados nos tempos de 3, 7, 14, 21 e 28, dias sendo incubados em estufa a 30°C.

Figura 14 - Biorreator utilizado para o ensaio de quantificação microbiana contendo o corpo de prova, imerso no meio de cultura por meio de uma fita de teflon



Fonte: O autor, 2020.

Figura 14 - Biorreatores utilizados para os ensaios eletroquímicos com o corpo de prova imerso no meio de cultura, na ausência e na presença de BRS

Fonte: O autor, 2020.

2.5 Quantificação microbiana

A quantificação microbiana foi realizada apenas para as células sésseis através do método do número mais provável (NMP). Para tal, foram preparados dois meios, o postgate E e a solução de diluição como descrito no item 2.3. Foram adicionados 9 mL de meio em frascos de penicilina de 10 mL, que foram posteriormente lacrados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

No momento da realização da quantificação microbiana, o cupom metálico foi retirado assepticamente do biorreator, lavado por imersão em água destilada, com o objetivo de remover as células livres, e transferido para um tubo falcon contendo 10 mL de solução de diluição. Em seguida, para a remoção do biofilme aderido no cupom, o tubo falcon foi agitado em vórtex por 4 minutos e sonicado em sistema de limpeza ultrassônica por 2 minutos. Após essa etapa, foram retiradas alíquotas de 4 mL para a quantificação das BRS, que foi feita da seguinte forma: os frascos de penicilina contendo os meios Postgate E e a solução de diluição foram organizados em caixas, sendo três frascos contendo meio E por fileira, completando 9 fileiras e 1 frasco contendo solução de diluição a partir da segunda fileira, completando 8 fileiras, conforme pode ser observado na Figura 16.

Figura 15 - Organização da caixa para o ensaio de quantificação microbiana

Fonte: O autor, 2020.

Antes da inoculação da amostra, foram adicionados 0,1 mL de solução de tioglicolato de sódio estéril (12,4 g L^{-1}) em cada frasco contendo 9 mL de meio E. Em seguida, foram inoculados 1 mL de amostra na primeira fileira e na solução de diluição da segunda fileira. Em seguida, esse frasco foi agitado em vórtex por trinta segundos e foi retirada uma alíquota de 4mL para os frascos com meio E da segunda fileira e a solução de diluição da terceira fileira, repetindo este procedimento até o final das nove fileiras. Para cada quantificação microbiana foram utilizados 35 frascos de penicilina, sendo 27 com solução de meio Postgate E e 8 contendo solução de diluição.

O resultado positivo para a presença de BRS foi avaliado pela coloração preta nos frascos, devido à formação de precipitado de sulfeto de ferro. A coloração rosa no frasco indica um resultado negativo. A não observação de qualquer coloração nos frascos foi um indicativo de que o oxigênio ainda presente no meio quando este foi inoculado, foi consumido. A Figura 17 mostra 3 frascos de penicilina após o ensaio de quantificação microbiana, com a coloração preta, sem coloração e com a coloração rosa.

Figura 16 - Frascos de penicilina após o ensaio de quantificação microbiana

Fonte: O autor, 2020.

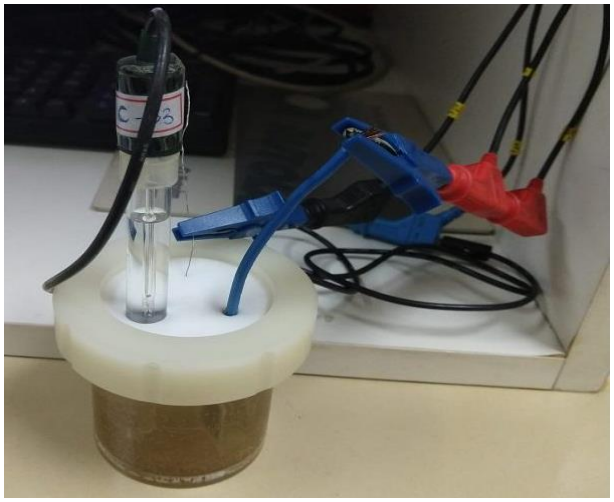
O tempo de incubação para o ensaio de quantificação microbiana foi de 28 dias, a temperatura de 30°C. A tabela utilizada como referência no método aplicado para o ensaio foi a usada no estudo de Harrigan (1997).

2.6 Ensaios eletroquímicos

Foram realizados ensaios eletroquímicos de impedância eletroquímica (EIE) e de polarização potenciodinâmica do aço carbono 1020 para os tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias, tanto para os ensaios abióticos quanto para os bióticos. Os ensaios com biocidas foram realizados apenas no tempo de 14 dias.

Para a realização dos ensaios, os corpos de prova foram retirados dos bioreatores, lavados com água destilada e em seguida foram colocados em 80 mL de solução 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$, preparada com a água de *sprinkler* filtrada, a fim de aumentar a condutividade do meio. Em seguida, foi montada uma célula eletroquímica com três eletrodos: o eletrodo de trabalho (eletrodo de aço carbono que foi previamente incubado no meio de cultura, com ou sem BRS e/ou com biocida), o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e um contra-eletrodo de platina, conforme apresentado Figura 18.

Figura 17 - Célula eletroquímica contendo três eletrodos



Fonte: O autor, 2020.

Todos os ensaios eletroquímicos foram realizados usando um potenciostato Autolab modelo 69 PGSTAT302N. Nos ensaios de EIE, foi utilizada uma faixa de frequência de 10^5 a 10^{-3} Hz, com uma amplitude de 10 mV. Para os ensaios de PP, a faixa de potencial aplicada foi de -1 a 1 V, com velocidade de varredura de 1 mV

s^{-1}. Todos os ensaios eletroquímicos foram feitos após estabilização do sistema em seu potencial de circuito aberto.

Os dados obtidos a partir dos ensaios de impedância eletroquímica (EIE) foram simulados através de circuitos elétricos equivalentes utilizando o software NOVA 1.10 Metrohm Autolab com o objetivo de se obter uma interpretação quantitativa dos processos corrosivos. O valor da capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) foi calculado a partir do elemento de fase constante (EFC) pela equação 2 (HIRSCHORN, et al., 2010):

$$C_{DCE} = EFC^{\frac{1}{N}} \, x \, \left[\frac{R_S \, x \, R_{tc}}{R_S + R_{tc}}\right]^{\frac{1-N}{N}} \quad (2)$$

Onde:

C_{DCE} = Capacitância da dupla camada elétrica;

EFC: Elemento de fase constante;

N = grau de equivalência do EFC para o componente capacitivo;

R_{tc} = Resistência à transferência de carga;

R_e = Resistência do eletrólito.

2.7 Ensaios com biocidas

Foram testados dois biocidas, sendo um comercial e um natural. O biocida comercial utilizado foi uma solução de glutaraldeído 25% (Sigma Aldrich) e o biocida natural foi o óleo de nim. A concentração do óleo de nim utilizada nos ensaios foi de 3% v/v, com base nos estudos de Swaroop et al. (2016). Segundo os autores, esta concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de uma cultura pura de *Arthrobacter sulfureus* em água destilada. Já a concentração de glutaraldeído utilizada no presente estudo foi de 50 ppm por estar dentro da gama de concentrações normalmente usadas para o tratamento de água (PEREIRA, 2001). Como o óleo de nim não é solúvel em solução aquosa, nos ensaios utilizando este biocida foi adicionado um surfactante, o laurato de potássio, na concentração de 10^{-3} mol L^{-1} (SILVA et al., 2001).

Os ensaios com biocidas foram realizados apenas no tempo de 14 dias de incubação e foram feitos com o objetivo de evitar o crescimento de BRS e a formação de biofilme na superfície do material. O procedimento realizado foi o mesmo descrito no item 2.4, porém, antes da inoculação com BRS foi adicionada a quantidade desejada de biocida.

2.8 Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A análise de MEV foi realizada para o tempo de imersão de 14 dias para os corpos de prova incubados na ausência e na presença de BRS e também para os corpos de prova inseridos nos meios inoculados com BRS e com biocidas.

Para essa análise, os corpos de prova foram retirados do biorreator e lavados por imersão em água destilada para a remoção das células livres. Em seguida, foram secos em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora. As amostras foram metalizadas com carbono utilizando o equipamento de modelo DENTON VACUUM DESK V e, em seguida, foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM G510 LV em alto vácuo, detector SEI, tensão 20kV, com aumentos de imagem de 500, 1000 e 5000X. Também foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), utilizando um equipamento acoplado ao microscópio JEOL JSM-6510LV (LabMEV/IQ/UERJ) a fim de determinar a composição química dos produtos de corrosão na superfície do material analisado.

As análises de MEV também foram realizadas após a remoção do biofilme. Para isso, os cupons metálicos foram tratados por decapagem ácida em solução de Clark por 4 minutos. Em seguida, os corpos de prova foram lavados com álccol etílico e secos com jato de ar quente. A solução de Clark era composta por 100 mL de HCl P.A., 2g de Sb_2O_3 e 5g de $SnCl_2$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais características determinadas na água de *sprinkler* utilizada no presente estudo são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 9 - Características da água de *sprinkler* utilizada nos ensaios

pH	Condutividade (mS cm^{-1})	SO_4^{2-} (mg/L)	Carbono Orgânico Total (mg/L)	Carbono Inorgânico (mg/L)	Carbono Total (mg/L)
9,1	0,385	31	39,82	15,04	54,86

Fonte: O autor, 2020.

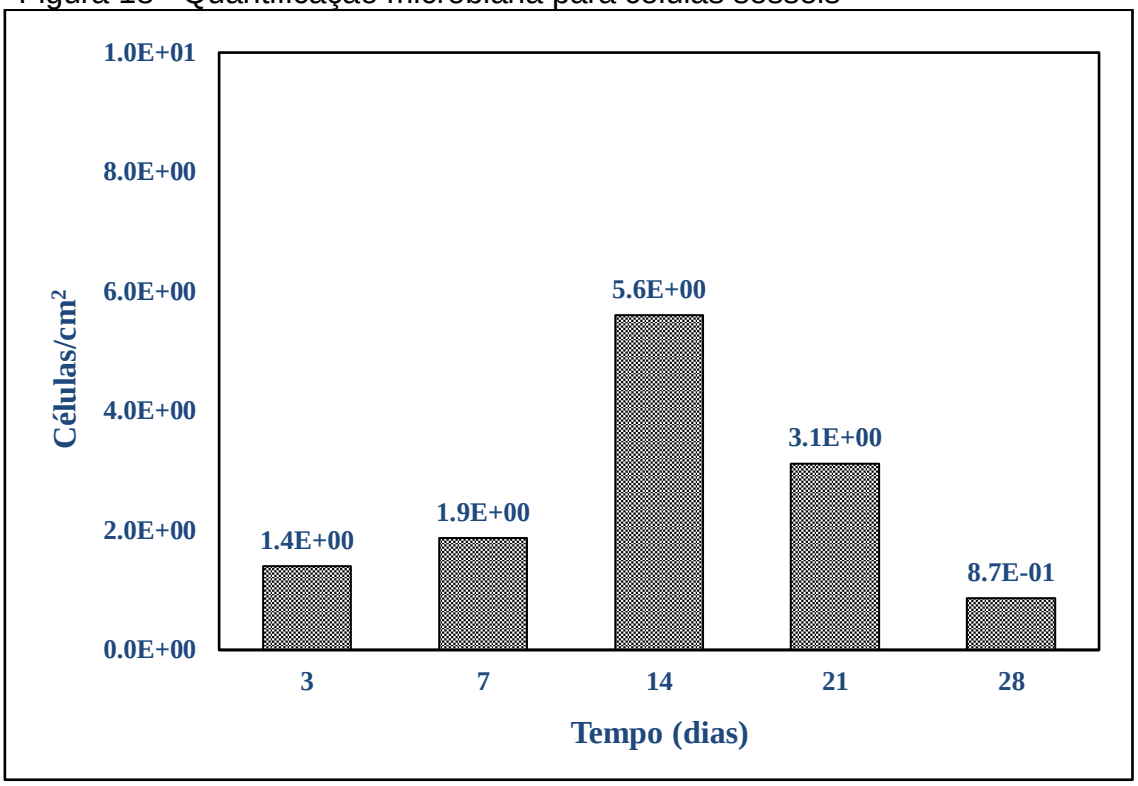
Pode ser observado que a água utilizada apresenta um baixo teor de sulfato e dessa maneira espera-se um baixo crescimento de BRS no meio. Pelo fato da amostra apresentar um baixo valor de condutividade, foi necessária a preparação de uma solução contendo 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para tornar possível o transporte de cargas nos ensaios eletroquímicos como mencionado no capítulo de materiais e métodos.

3.1 Avaliação da corrosão microbiologicamente induzida

3.1.1 Avaliação do crescimento microbiano

O inóculo inicial utilizado em todos os ensaios foi de 30 células/mL. A quantificação microbiana, feita pelo método NMP, foi realizada para as BRS sésseis, ou seja, aquelas aderidas ao substrato metálico nos tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 19.

Figura 18 - Quantificação microbiana para células sésseis



Fonte: O autor, 2020.

Observando os resultados apresentados, pode-se notar que as concentrações de BRS sésseis encontradas foram baixas. Isso ocorre devido à baixa concentração de SO_4^{2-} na água utilizada no estudo, como mostrado na Tabela 6. Silva (2013) quantificou o número de BRS sésseis em água de sistemas de resfriamento industrial e encontrou o valor de 1,2 x 10^2 para o tempo de imersão de 7 dias. Além disso, nota-se na Figura 19 que houve um crescimento das células sésseis até o 14° dia de ensaio, sendo esse tempo o que apresentou a maior concentração de BRS séssil. O aumento do número de BRS pode ser evidenciado pela coloração preta apresentada no meio proveniente da formação de FeS.

Esse crescimento confirma que este grupo de bactérias é capaz de colonizar e aderir em superfícies sólidas. O que favorece essa aderência é o fato das BRS produzirem substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (BEECH et al., 1991; ZINKEVICH et al., 1996; PÉREZ et al., 2007).

Após 14 dias, houve um decréscimo do número de BRS aderidas à superfície. Essa redução provavelmente ocorreu devido à falta de nutrientes. À medida que os nutrientes se tornaram insuficientes, a densidade celular

naturalmente diminuiu (MADIGAN, 2016). Além disso, a concentração de H_2S no meio tende a aumentar proporcionalmente com o aumento do número de células.

É importante mencionar que o H_2S em concentrações elevadas inibe o crescimento de BRS. Essa espécie pode estar presente na forma de H_2S solúvel, HS^- e S^{2-}, dependendo do pH do meio (STEFANIE *et al*., 1994). A forma H_2S solúvel é considerada a mais tóxica devido à molécula neutra poder permear a membrana celular da BRS (PAULA, 2010).

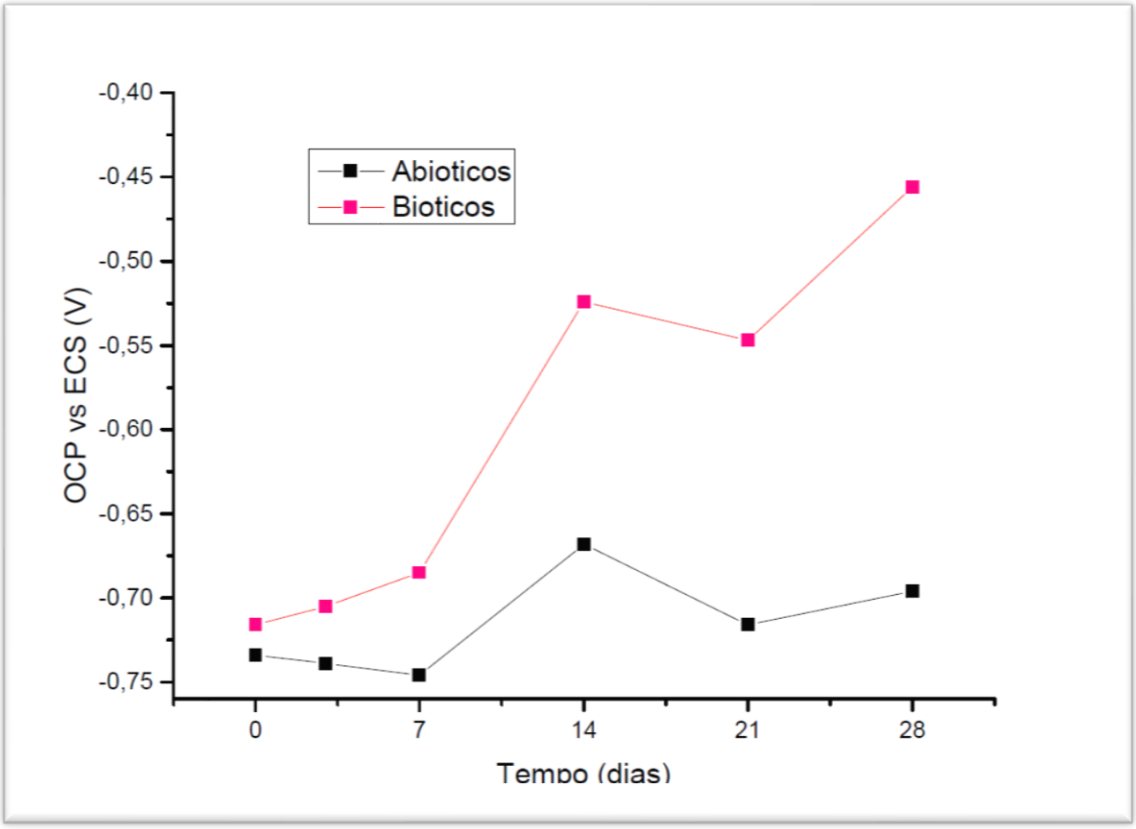
3.1.2 Ensaios eletroquímicos

Os ensaios eletroquímicos foram realizados pelo mesmo período de tempo em que os ensaios de quantificação.

3.1.2.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 20 mostra o potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ e pH = 8,48 medido para cada tempo de ensaio, na ausência e na presença de BRS. O $NaNO_3$ foi adicionado na água com o objetivo de aumentar a condutividade do meio, a fim de permitir a condução das espécies carregadas no meio e, consequentemente, as medidas eletroquímicas necessárias. A água utilizada no presente estudo possui baixa condutividade como mostrado na Tabela 8. A concentração de sal utilizada foi determinada de modo a obter uma condutividade no meio próxima a do eletrodo de calomelano utilizado nos ensaios.

Figura 19 - Potencial de circuito aberto (OCP) do aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para todos os tempos de ensaio na ausência (abiótico) e na presença (biótico) de BRS



Fonte: O autor, 2020.

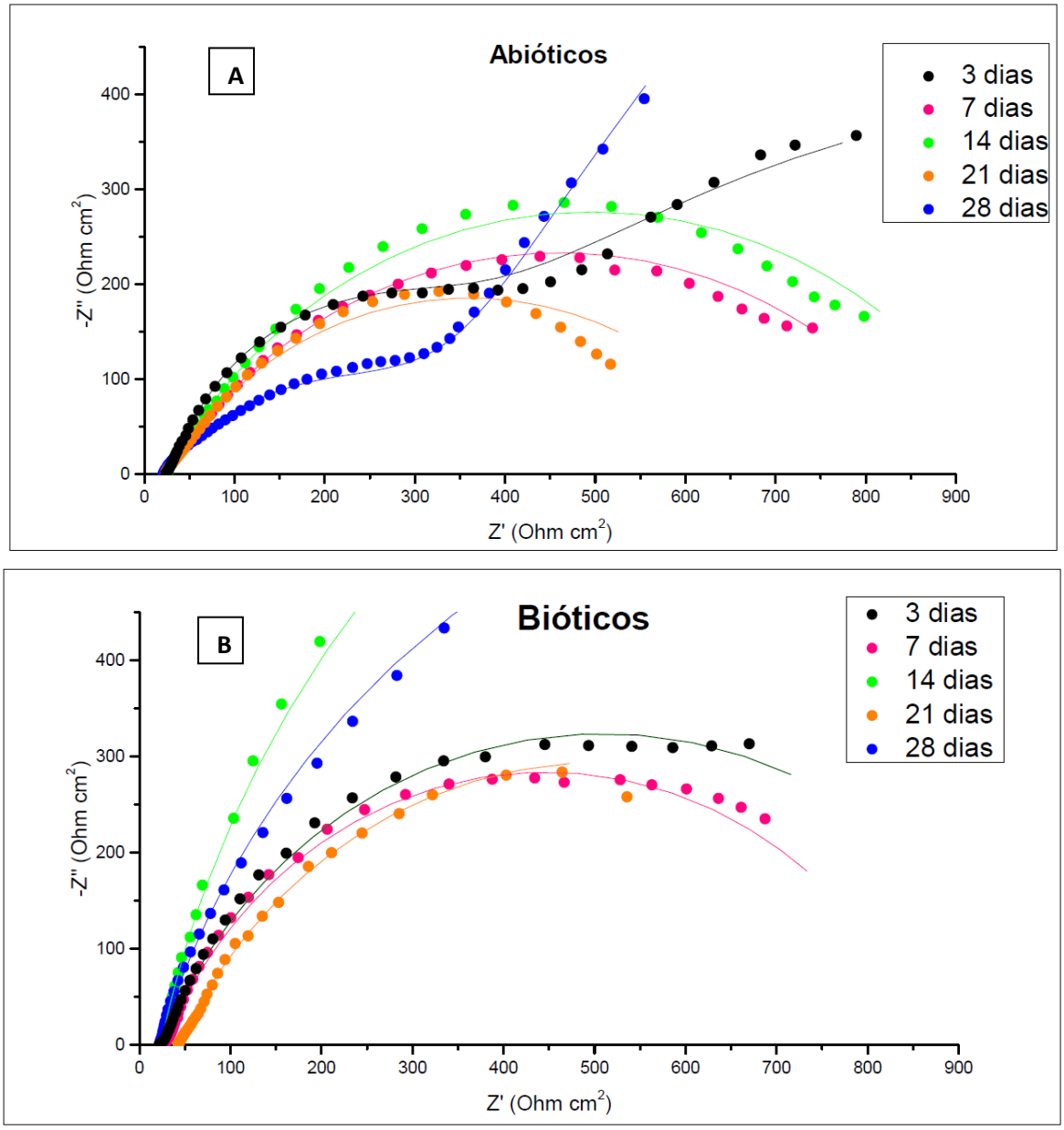
Como pode ser observado, para todos os tempos de ensaio houve um deslocamento do potencial de circuito aberto para valores mais positivos nos ensaios bióticos, ou seja, aqueles na presença de microrganismos. Este fenômeno é conhecido na literatura como “enobrecimento” e tem sido relatado para explicar o desenvolvimento de biofilmes marinhos nas superfícies de ligas passivas, independente se o ambiente no qual o material está sujeito é água salina ou água salobra (HUTTUNEN-SAARIVIRTA et al., 2018). De acordo com Alabbas et al. (2013), o fenômeno de “enobrecimento” tem sido atribuído à reprodução e colonização das BRS na superfície do corpo de prova. Essas bactérias formam um biofilme que altera os processos eletroquímicos na superfície do material (ALABBAS et al., 2013).

No presente estudo, o biofilme formado na superfície do material estudado pode ter inibido inicialmente o processo corrosivo causando o deslocamento do potencial de circuito aberto para valores mais positivos.

3.1.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

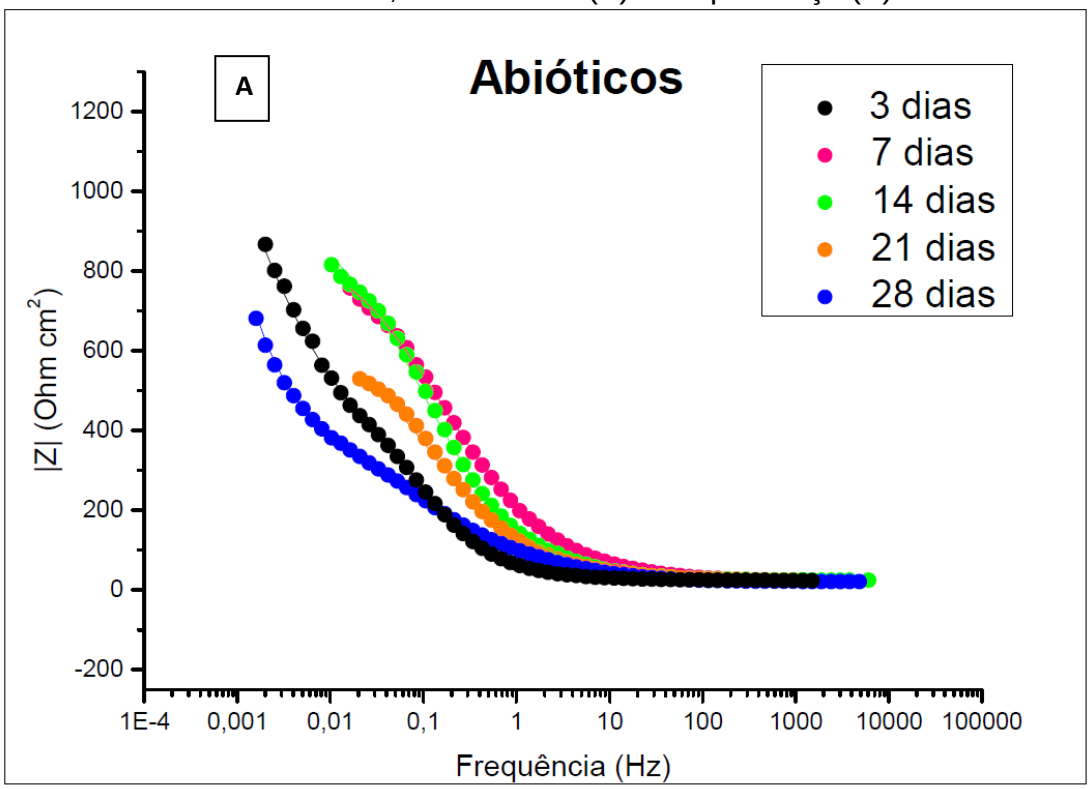
Os diagramas de Nyquist, |Z| e Fase para o aço carbono 1020 em água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (abiótico) e na presença (biótico) de BRS em diferentes tempos de ensaio, são apresentados nas Figuras 21, 22 e 23 respectivamente.

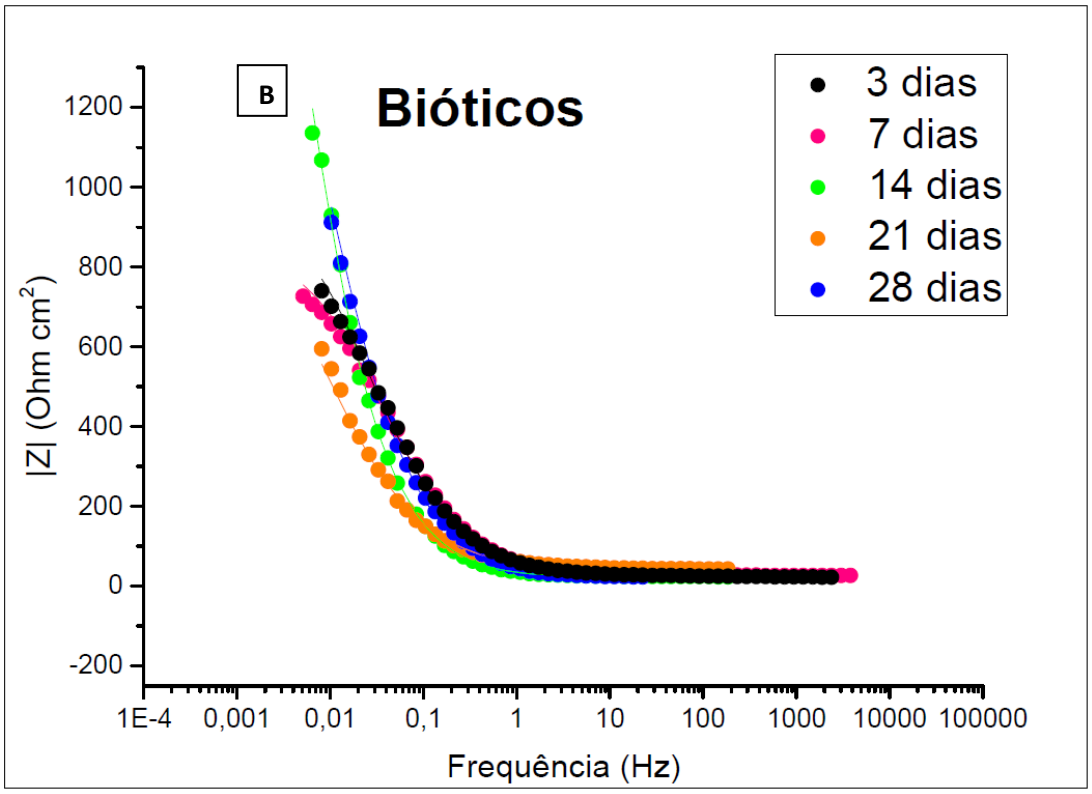
Figura 20 - Diagrama de Nyquist para o aço carbono 1020 em água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (A) e na presença (B) de BRS



Fonte: O autor, 2020.

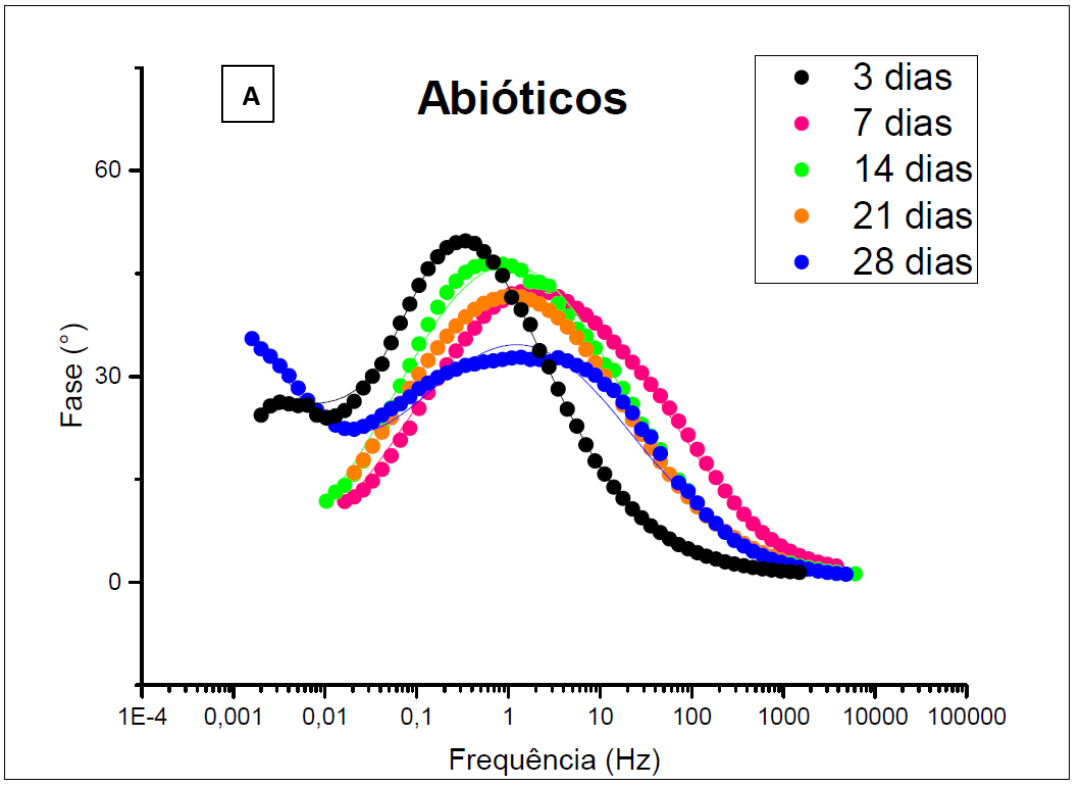
Figura 21 - Diagrama de |Z| para o aço carbono 1020 em água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (A) e na presença (B) de BRS

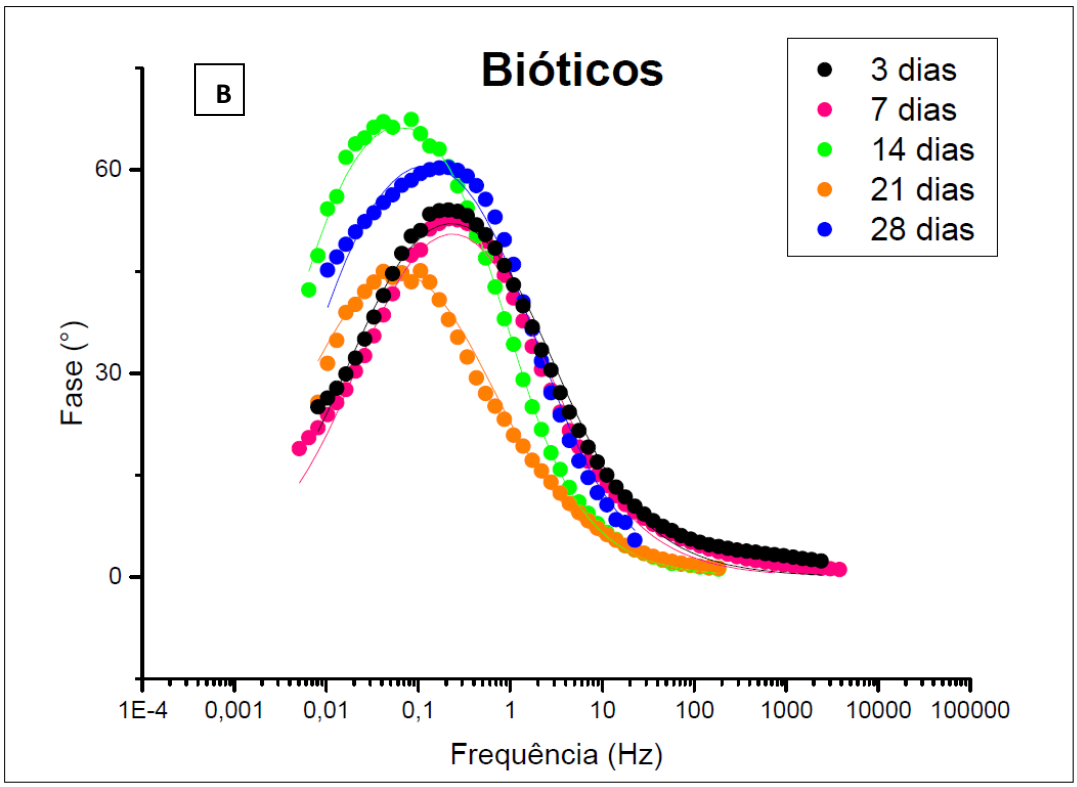




Fonte: O autor, 2020.

Figura 22 - Diagrama de Fase para o aço carbono 1020 em água de *sprinkler* industrial com 0,2mol L^{-1} de $NaNO_3$ incubados previamente em meio de cultura, na ausência (A) e na presença (B) de BRS





Fonte: O autor, 2020.

Observando a Figura 21 A, verifica-se que há um comportamento irregular nos perfis das curvas de Nyquist para os ensaios abióticos. Além disso, para os tempos de ensaio de 3 e 28 dias, pode-se observar dois arcos capacitivos, indicando que duas constantes de tempo regem o processo. Swaroop et al. (2016) observaram o mesmo comportamento nos diagramas de Nyquist para os ensaios bióticos avaliando a corrosão de cupons de cobre em água destilada na presença de *Arthrobacter sulfureus* e atribuiu esse comportamento à formação de um filme poroso e não protetivo na superfície do material. No presente trabalho, esse fato ocorre provavelmente pela formação de um filme, devido aos produtos de corrosão na superfície do substrato que não são estáveis.

Para os ensaios na presença de BRS, na Figura 21 B, também pode-se observar uma variação irregular do tamanho do arco capacitivo para os diferentes tempos de ensaio. Também pode ser observado que o tempo de 14 dias foi o que apresentou um maior tamanho do arco capacitivo. Na quantificação microbiana o número de BRS aumentou até 14 dias de ensaio e após esse tempo foi observado que o número de microrganismos diminuiu. Apesar do tempo de ensaio de 28 dias ter apresentado um menor número de células, foi observado um aumento no tamanho do diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist. Esse fato provavelmente ocorreu devido à formação de produtos de corrosão que se aderem à superfície do material e juntamente com os metabólitos produzidos pelas bactérias conferem uma certa proteção ao material. Silva (2015) observou um resultado similar no estudo da corrosão do aço carbono 1020 em meio de água do mar. Na ocasião, a autora observou um aumento no valor de R_{tc} para o tempo de imersão de 21 dias mesmo não havendo diferenças significativas no número de bactérias sésseis aderidas à superfície do metal entre os tempos de 7 e 21 dias de imersão.

Comparando os resultados dos ensaios abióticos (na ausência de microrganismos) com os bióticos (na presença de microrganismos), pode-se verificar que para todos os tempos de ensaio o tamanho do arco capacitivo, representado pelo diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist é maior na presença de microrganismos.

Já os gráficos de |Z| evidenciam, para os tempos de 7, 14 e 21 dias, que na presença de BRS houve uma redução no valor do módulo de Z e um deslocamento das curvas para valores de menor frequência quando comparados com os ensaios

abióticos. Para os diagramas de fase, na Figura 23, pode-se notar um deslocamento do valor máximo do ângulo de fase para menores valores de frequência nos ensaios bióticos em comparação com os abióticos para todos os tempos de ensaio. Esse deslocamento é mais discreto nos tempos de 3 e 28 dias. Com esse resultado pode-se afirmar que houve a formação de um biofilme condutor na superfície no metal analisado nos meios na presença de BRS.

Para uma melhor interpretação, os resultados de EIE podem ser apresentados em termos de modelos de circuitos elétricos, onde os dados referentes à resistência de transferência de carga (R_{tc}) e a capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) são obtidos pela simulação do processo eletroquímico (Carvalho e Andrade, 2006). Na presente dissertação, os diagramas de impedância foram simulados utilizando os circuitos apresentados na Figura 21, que são representadas por linhas contínuas nos diagramas de Nyquist, |Z| e Fase.

O circuito simples da Figura 24 A foi utilizado na maioria dos ensaios, exceto para os ensaios abióticos nos tempos de 3 e 28 dias. Nestes casos, o circuito da Figura 24 B foi utilizado para simular os diagramas por terem apresentado dois arcos capacitivos em série, apresentando além da resistência à transferência de carga, a resistência do filme na superfície do metal.

Figura 23 - Modelos de circuitos equivalentes utilizados para simular os dados de EIE nos tempos de 7, 14 e 21 dias (A) e 3 e 28 dias (B), sendo: (Re - resistência do eletrólito, Rtc - resistência à transferência de carga, EFC - elemento de fase constante).

Fonte: O autor, 2020.

A Tabela 9 apresenta os valores da simulação dos dados da EIE obtidos a partir dos circuitos elétricos da Figura 24. Os valores da C_{DCE} foram calculados pela equação 2 do capítulo de materiais e métodos. Na tabela também são apresentados os valores de N, termo que define o grau de equivalência do elemento de fase constante para um componente capacitivo (CASTANEDA; BENETTON,

2008). Em todos os casos, os ajustes da simulação foram considerados bons para um valor de erro menor ou próximo de 1%.

Tabela 10 - Parâmetros simulados em circuitos equivalentes para o aço carbono 1020 em meio de água de *spri nkler* industrial com 0,2mol L^{-1} de $NaNO_3$ na presença (abiótico) e na ausência (biótico) de bactéria

	Abiótico							Biótico						
Tempo (dias)	**Re (Ω)**	**R_{tc} (Ω cm²)**	**EFC (Mho)**	**C_{DCE} (mF cm⁻²)**	**N**	**X²**	**Área do CP (cm²)**	**Re (Ω)**	**R_{tc} (Ω cm²)**	**EFC (Mho)**	**C_{DCE} (mF cm⁻²)**	**N**	**X²**	**Área do CP (cm²)**
3	12,2	1927,62	0,00931	2,22	0,737	0,012	1,92	14,4	970,20	0,00836	2,48	0,75	0,119	1,65
7	11,6	875,52	0,00269	0,170	0,624	0,022	1,92	15,4	837,00	0,00897	2,63	0,759	0,103	1,80
14	12,3	942,48	0,00377	0,431	0,676	0,043	1,98	15,7	2190,00	0,0148	7,81	0,863	0,025	1,50
21	13,2	674,08	0,0042	0,463	0,641	0,068	1,76	14,5	933,00	0,0304	7,20	0,717	0,068	3,0
28	11,9	3836,8	0,00591	0,895	0,668	0,102	1,76	11,1	1689,60	0,0127	4,09	0,804	0,102	1,92

Re - resistência do eletrólito, R_{tc} – resistência à resistência à transferência de carga, EFC - elemento de fase constante; C_{DCE} = Capacitância da dupla camada elétrica; N = grau de equivalência do EFC para o componente capacitivo.); CP: corpo de prova.

Fonte: O autor, 2020.

Analisando os dados da Tabela 9, pode-se observar que há uma variação irregular nos valores de R_{tc} nos ensaios abióticos, assim como observado no perfil dos arcos capacitivos no diagrama de Nyquist apresentado na Figura 21. Esse comportamento ocorre, provavelmente, devido à formação e ao desprendimento de um produto de corrosão não estável na superfície do corpo de prova (SILVA, 2015).

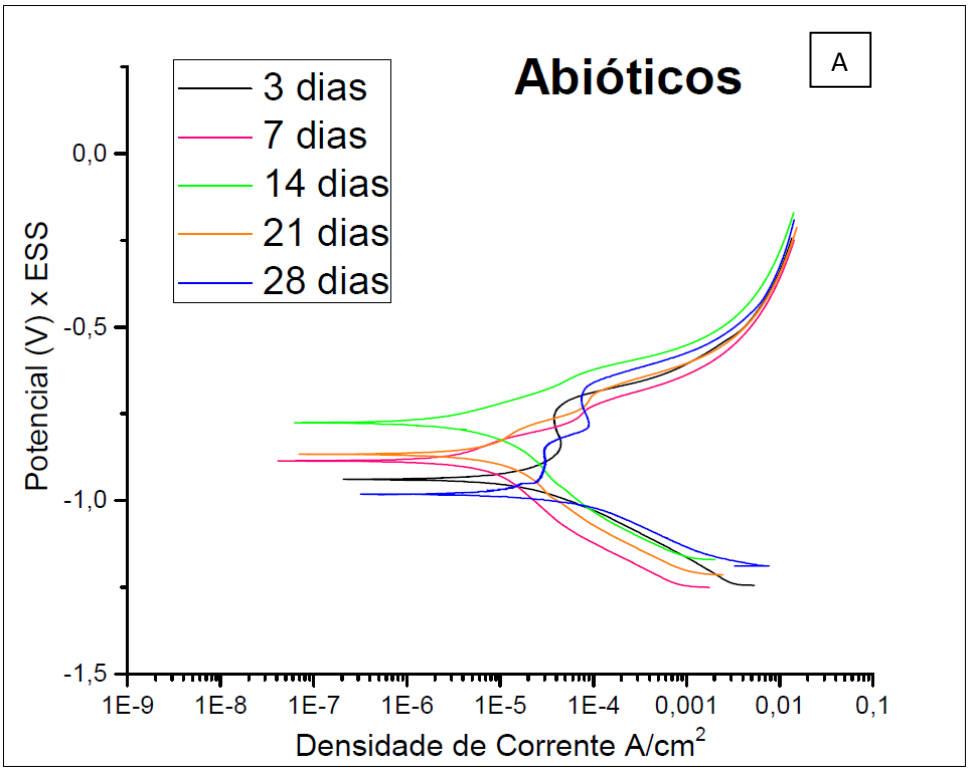
Comparando os ensaios abióticos com os ensaios bióticos pode-se observar que, com exceção dos tempos de 14 e 21 dias, os valores de R_{tc} foram menores nos ensaios na presença de BRS e houve um aumento nos valores da C_{DCE}, indicando uma aceleração do processo corrosivo na presença da bactéria. Esse resultado indica que os produtos gerados pelas BRS, como as substâncias poliméricas extracelulares e os íons sulfetos podem ser adsorvidos na superfície do material, alterando as propriedades eletroquímicas na interface metal/solução juntamente com os produtos de corrosão formados, acelerando assim o processo corrosivo (SILVA, 2015).

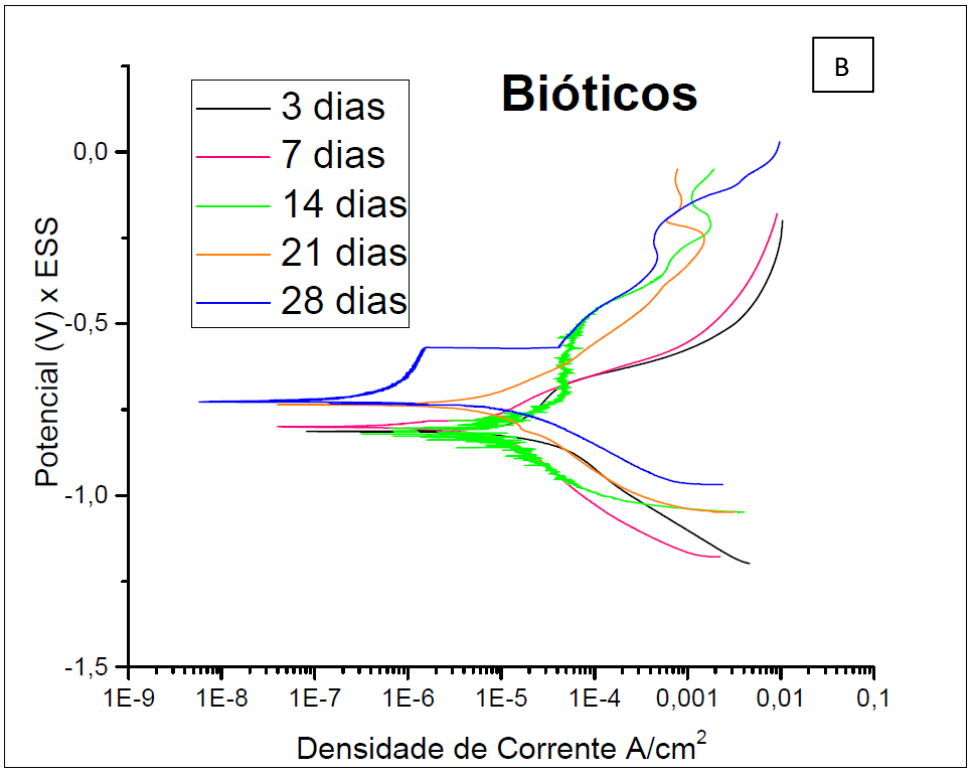
Analisando os valores de R_{tc} nos tempos de ensaio na presença de BRS também pode-se notar uma variação em todos os tempos de ensaio, o que está relacionado provavelmente com a estabilidade do biofilme formado na superfície do aço carbono. Houve uma redução significativa do valor de R_{tc} em 21 dias e com 28 dias o valor de R_{tc} volta a aumentar. Observando o resultado de quantificação microbiana da Figura 19, pode-se notar que o número de bactérias sésseis aumentou até 14 dias de ensaio e após esse tempo, diminuiu. Com 28 dias de ensaio, os metabólitos produzidos pelas bactérias, juntamente com os produtos de corrosão formados pode ter promovido um aumento da espessura do filme e, consequentemente, conferido certa proteção ao substrato aumentando o valor de R_{tc} e o diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist, mesmo esse tempo de ensaio apresentando um menor número de bactérias sésseis aderidas à superfície do material (SILVA, 2015). Assim como os valores de Rtc, os valores de C_{DCE} também variaram de forma irregular nos ensaios bióticos, estando relacionado a estabilidade do biofilme formado.

3.1.2.3 Polarização potenciodinâmica

Nas Figuras 25 A e B são apresentadas as curvas de polarização, catódicas e anódicas para os ensaios na ausência e na presença de BRS respectivamente. As presentes curvas foram obtidas para os corpos de prova de aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$. Os corpos de prova foram previamente incubados em meio de cultura na ausência (abióticos) e na presença (bióticos) de BRS nos tempos de ensaio de 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Os parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da extrapolação das retas de Tafel são apresentados na Tabela 10.

Figura 24 - Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para os tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias de ensaio, na ausência (A) e na presença (B) de BRS





Fonte: O autor, 2020.

Tabela 11 - Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da extrapolação das retas de Tafel para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ nos tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias de ensaio na ausência (abiótico) e presença (biótico) de BRS

	Abiótico				**Biótico**			
Tempo (dias)	**E_{corr} (V)**	**j_{corr} (μA/ cm^2)**	**β_a (V/dec)**	**β_c (V/dec)**	**E_{corr} (V)**	**j_{corr} (μA/ cm^2)**	**β_a (V/dec)**	**β_c (V/dec)**
3	-0,94	9,65	0,08	0,10	-0,81	4,21	0,028	0,049
7	-0,88	3,00	0,099	0,098	-0,80	0,304	0,007	0,022
14	-0,76	2,247	0,064	0,094	-0,81	3,43	0,083	0,067
21	-0,87	4,70	0,116	0,092	-0,73	1,58	0,039	0,034
28	-0,98	3,65	0,011	0,034	-0,71	0,683	0,0283	0,0406

E_{corr}: Potencial de corrosão; j_{corr}: densidade de corrente de corrosão; β_a: coeficiente de Tafel anódico; β_c: coeficiente de tafel catódico.
Fonte: O autor, 2020.

Observando-se a Figura 25 A, verifica-se que até 14 dias de ensaio há uma tendência do deslocamento do E_{corr} para valores mais positivos (mais nobres). Após 14 dias, observa-se um deslocamento para valores mais negativos.

Analisando os perfis das curvas de polarização obtida a partir dos corpos de prova previamente incubados em meio de cultura na presença de BRS (Figura 25 B) verifica-se que não há variação significativa entre os potenciais nos E_{corr} até 14 dias de ensaio, sendo deslocado para valores mais positivos em 28 dias. Esse comportamento é confirmado com os valores da Tabela 10. O tempo de ensaio de 28 dias apresentou um valor de E_{corr} mais positivo confirmando os resultados de EIE.

Comparando os ensaios na ausência (abióticos) e na presença (bióticos) de BRS pode-se observar que os valores de E_{corr} foram deslocados para valores mais positivos para todos os tempos de ensaio com exceção do tempo de 14 dias na presença da bactéria. Também pode ser verificada uma redução nos valores de densidade de corrosão (j_{corr}) para todos os tempos de ensaio, excetuando-se também o tempo de 14 dias. Além disso, houve variações significativas nos valores de β_a e β_c entre os ensaios bióticos e abióticos em todos os tempos de ensaio, o que sugere que os microrganismos presentes nos meios de cultura provocam alterações tanto nas semi-reações anódicas quanto nas catódicas (PAULA, 2010). Apesar dos valores de E_{corr} estarem sendo

deslocados para valores mais positivos e o j_{corr} estarem reduzindo na presença de BRS, os valores de β_c reduziram em todos os tempos de ensaio com exceção do tempo de 28 dias que não apresentou diferença significativa. Essas variações catódicas indicam que o processo de despolarização catódica está sendo favorecido, provavelmente devido à formação do biofilme na superfície do metal.

Vale ressaltar que, apesar do tempo de ensaio de 14 dias ter apresentado um maior arco capacitivo no diagrama de Nyquist, foi observado nos diagramas de |Z| e fase um deslocamento das curvas para valores de menor frequência, indicando a presença de um biofilme condutor na superfície do material. Além disso, no ensaio de polarização potenciodinâmica, pode ser observado um valor mais positivo do E_{corr} e um aumento do valor de j_{corr} para esse tempo de ensaio, e também uma redução no valor de β_c, indicando que há um processo corrosivo sendo acelerado pela presença de BRS nesse tempo de ensaio. Levando em consideração esses resultados e, ter sido evidenciado um maior número de células microbianas em 14 dias de ensaio, este foi o tempo escolhido para os ensaios com biocidas e microscopia eletrônica de varredura.

3.1.3 Ensaios com Biocidas

No presente estudo foram testados dois biocidas, sendo um comercial (glutaraldeído) e um natural (óleo de nim). O tempo de incubação escolhido para os ensaios foi o de 14 dias, levando em consideração os resultados dos ensaios eletroquímicos e a quantificação microbiana, como descrito no item anterior. Além disso, segundo Su, Tian, Peng (2014), normalmente o ciclo de dosagem de biocida é realizado no tempo de 15 dias.

O glutaraldeído é um biocida comercial bastante empregado no tratamento de água e é efetivo no controle de crescimento de BRS, porém possui a desvantagem de ser tóxico. Sendo assim, também foi avaliado o óleo de nim que é um biocida natural, como mencionado anteriormente.

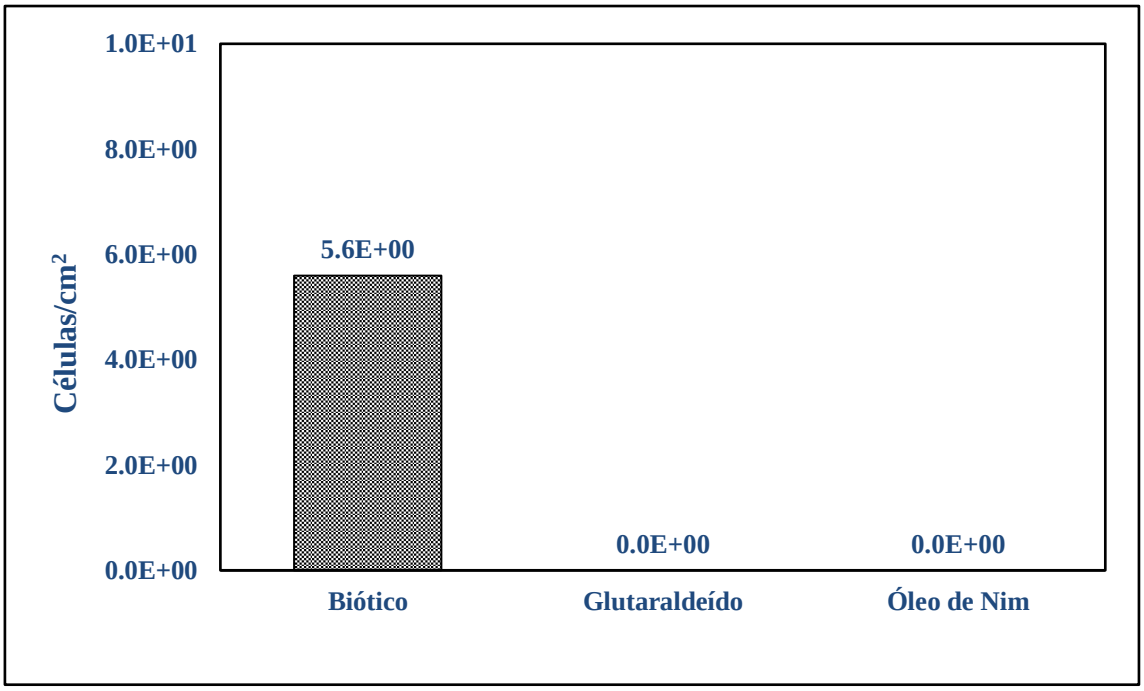
Ambos os biocidas foram adicionados ao meio de cultura antes da inoculação com a bactéria de modo a evitar o crescimento e aderência das células ao corpo de prova. Os resultados encontrados serão apresentados a

seguir e foram comparados com os apresentados anteriormente, na ausência e na presença de BRS sem a adição de biocidas.

3.1.3.1 Avaliação do crescimento microbiano

A quantificação microbiana para as BRS sésseis, obtida pelo método do NMP, para os ensaios com os biocidas glutaraldeído e óleo de nim, em comparação ao ensaio biótico com o tempo de incubação de 14 dias, é apresentada na Figura 26.

Figura 25 - Quantificação microbiana de células sésseis para os ensaios com biocidas e para o ensaio biótico



Fonte: O autor, 2020.

Como pode ser observado, não houve crescimento de células sésseis de BRS para ambos os biocidas adicionados, indicando que as concentrações de glutaraldeído (50 ppm) e óleo de nim (3% v/v) foram suficientes para inibir o crescimento de BRS na superfície do material estudado. Esse resultado é similar ao encontrado por Swaroop, Victoria, Manivannan (2016) em que a concentração de extrato de nim de 3% v/v inibiu o crescimento bacteriano de

Arthrobacter sulfureus em cupons de cobre utilizando água destilada como meio eletrolítico. Cabe ressaltar, que a concentração de BRS na superfície do material era baixa no tempo de incubação do corpo de prova de 14 dias.

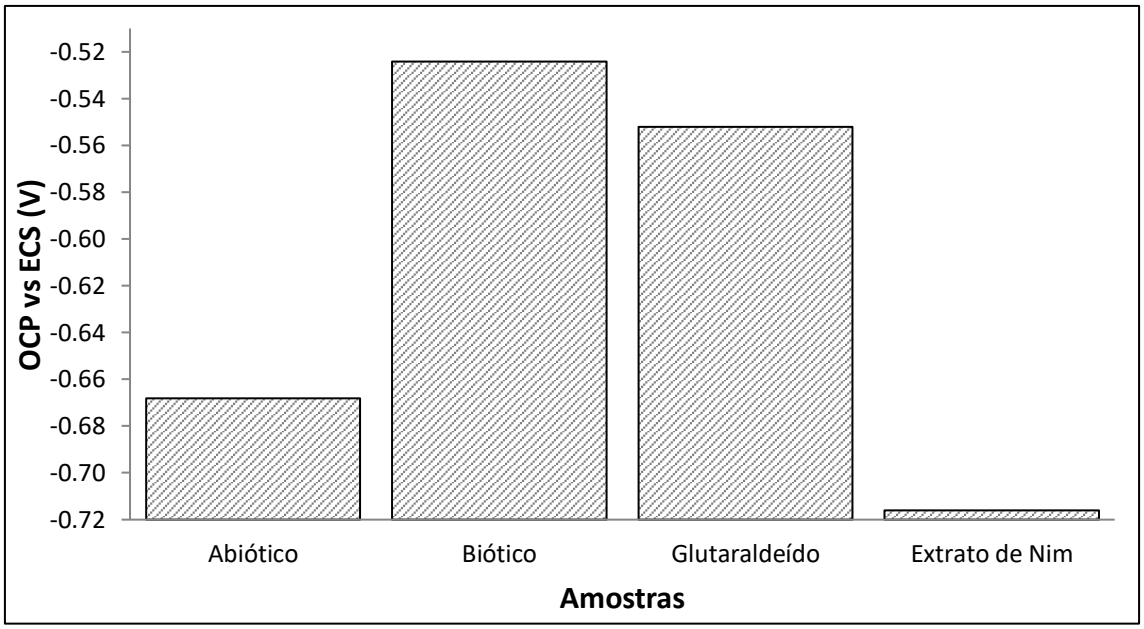
Com relação ao glutaraldeído, os resultados estão de acordo com Lin et al. (2013). Os autores estudaram a inibição da corrosão em aço inox 304 causada por BRS em meio de água de resfriamento e concluíram que a adição de glutaraldeído ao sistema é efetivo para matar as bactérias.

3.1.3.2 Ensaios eletroquímicos

3.1.3.2.1 Potencial de circuito aberto (OCP)

A Figura 27 mostra a variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial para os ensaios na ausência (abiótico) e presença (biótico) de BRS, assim como com adição de glutaraldeído (50 ppm) e óleo de nim (3% v/v) adicionados no meio antes da inoculação da bactéria.

Figura 26 - Variação do potencial de circuito aberto do aço carbono 1020, previamente incubado em meio na ausência e na presença de BRS e os biocidas estudados, em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$



Fonte: O autor, 2020.

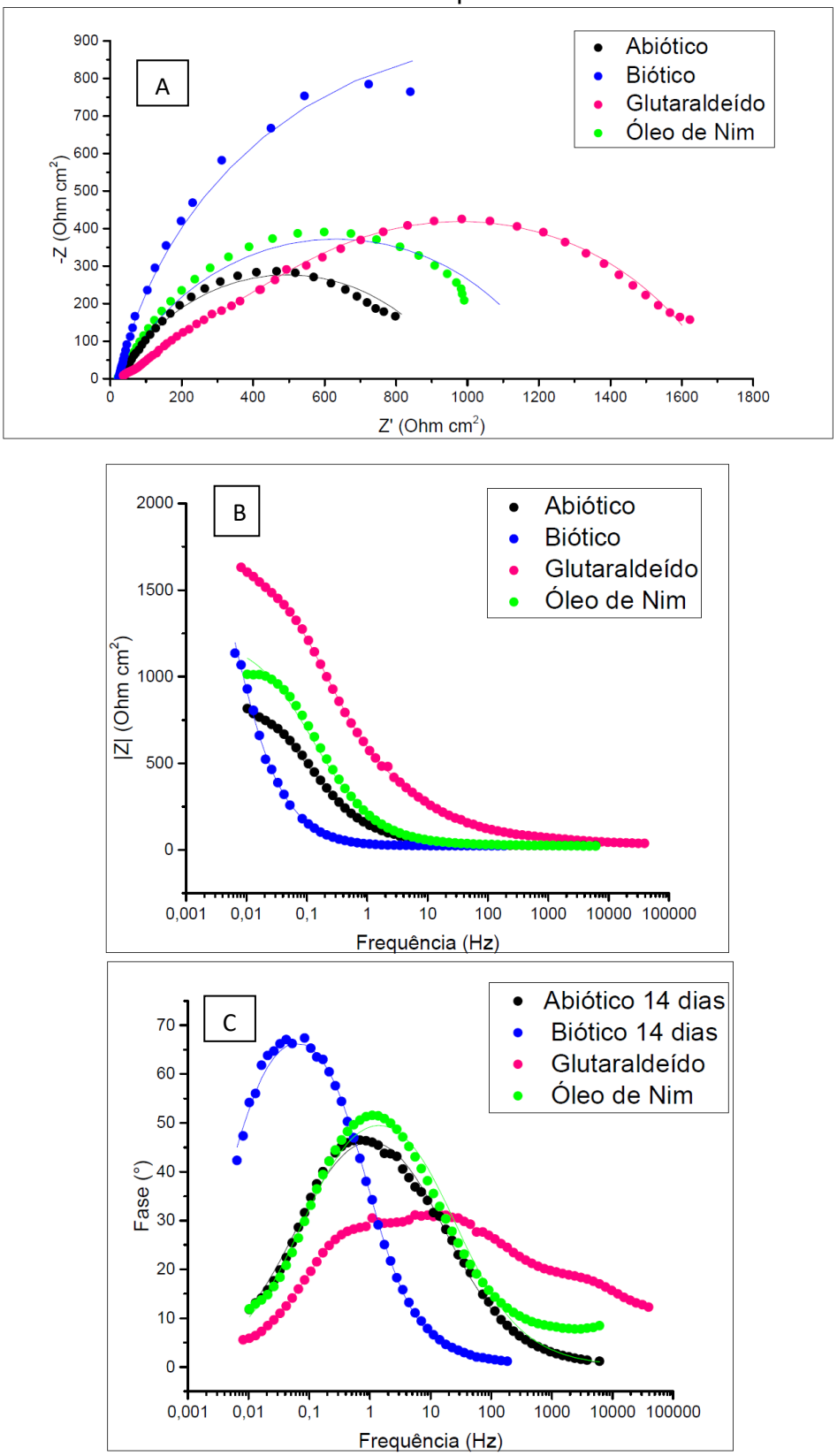
Analisando a Figura 27, pode-se observar que a adição dos biocidas deslocou o potencial de circuito aberto para valores mais negativos do que o encontrado para o ensaio biótico, ou seja, na presença de BRS. O OCP para o ensaio biótico foi de -0,524V, enquanto que o encontrado após a adição de glutaraldeído foi de -0,552 V e com óleo de nim foi de -0,716V.

Como descrito anteriormente, no meio com a presença da bactéria, houve um deslocamento do OCP para valores mais positivos por causa do fenômeno de enobrecimento devido à formação de biofilme. Com a adição de biocidas, o crescimento microbiano é inibido reduzindo a colonização de microrganismos na superfície do aço e, consequentemente, a formação do biofilme. Sendo assim, com os valores obtidos para o potencial de circuito aberto, pode-se dizer que a adição de biocidas evitou o processo de enobrecimento do material analisado, devido à inibição do crescimento microbiano no meio e a consequente colonização de microrganismos na superfície metálica, confirmando o que foi verificado na quantificação microbiana.

3.1.3.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Os diagramas de Nyquist, |Z| e fase para os ensaios com os biocidas selecionados adicionados em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$, comparando com os ensaios abióticos e bióticos sem a adição de biocidas são apresentados na Figura 28.

Figura 27 - Diagrama de Nyquist (A), |Z| (B) e Fase (C) para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ previamente incubado na ausência (abiótico), presença (biótico) e com a adição dos biocidas estudados por 14 dias

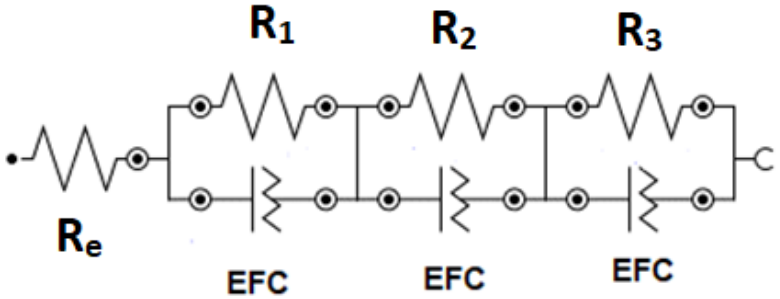


Fonte: O autor, 2020.

Analisando os diagramas da Figura 28A, pode ser observado, no diagrama de Nyquist, uma redução no tamanho do arco capacitivo após a adição dos biocidas, quando comparado com os resultados obtidos para o meio biótico sem biocidas. Já para os diagramas de |Z| e fase (Figuras 28 B e 28 C, respectivamente), pode ser observado que, para o ensaio biótico na ausência de biocida, houve um deslocamento da curva para menores valores de frequência, sugerindo que o biofilme é condutor e acelera o processo corrosivo na superfície do metal. Com a adição de biocidas, há uma redução do processo corrosivo, sendo confirmada com o deslocamento da curva para maiores valores de frequencia dos diagramas de Bode (Módulo e Fase). Esses resultados são similares aos encontrados por Su, Tian e Peng (2014) que estudaram a influência de hipoclorito de sódio como biocida na corrosão de aço carbono em meio de água de resfriamento, obtendo uma redução do processo corrosivo com a adição do biocida.

Assim como os ensaios abióticos e bióticos, os ensaios de impedância eletroquímica com biocidas também foram simulados com modelos de circuitos elétricos. O ensaio com óleo de nim foi simulado com o modelo de circuito simples apresentado na Figura 24 A. O ensaio com glutaraldeído foi simulado utilizando o modelo de circuito elétrico apresentado na Figura 29 por apresentar três arcos capacitivos em série.

Figura 28 - Circuito elétrico utilizado na simulação dos dados de EIE para o ensaio com a adição de glutaraldeído



Fonte: O autor, 2020.

Na Tabela 11 são apresentados os valores da simulação dos dados da EIE para os ensaios com biocidas no tempo de ensaio de 14 dias assim como

os parâmetros dos ensaios abiótico e biótico para o mesmo tempo de ensaio para fins de comparação.

Tabela 12 - Parâmetros simulados em circuitos equivalentes para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ na presença (abiótico) e na ausência (biótico) de bactéria e após a adição de biocidas para o tempo de incubação do corpo de prova de 14 dias

Amostras	Re (Ω)	R_{tc} (Ω m^2)	EFC (Mho)	C_{DCE} (mF cm^{-2})	N	X^2	Área do CP (cm^2)
Abiótico	12,3	942	0,00377	0,431	0,676	0,0429	1,98
Biótico	15,7	2190	0,0148	7,81	0,863	0,0249	1,50
Glutaraldeído	20,3	1676	$7,10x10^{-9}$	$6,28x10^{-12}$	0,710	0,0647	1,80
Óleo de Nim	7,96	1218	0,00391	$2,84x10^{-4}$	0,699	0,3083	3,06

R_e - resistência do eletrólito, R_{tc} - resistência à transferência de carga, EFC - elemento de fase constante, C_{DCE} - Capacitância da dupla camada elétrica, N - grau de equivalência do EFC para o componente capacitivo, CP - corpo de prova.
Fonte: O autor, 2020.

De acordo com os valores da Tabela 11 pode-se observar uma diminuição nos valores de R_{tc} após a adição dos biocidas quando comparados com o valor de R_{tc} do ensaio biótico, o que poderia sugerir um possível aumento do processo corrosivo. Porém, quando comparado com o meio abiótico, percebe-se que há um aumento do Rtc, indicando que a presença dos biocidas oferece uma proteção anticorrosiva ao substrato. Su, Tian e Peng (2014) também encontraram maiores valores de R_{tc} no ensaio biótico na presença de biocida (hipoclorito de sódio) em relação ao ensaio abiótico no tempo de 15 dias. Os autores estudaram a influência do hipoclorito de sódio como biocida na corrosão de aço carbono em meio de água de resfriamento. Como mencionado anteriormente, os perfis dos gráficos de |Z| e fase mostram um deslocamento das curvas para valores de maior frequência nos ensaios com biocidas, evidenciando possivelmente, uma diminuição do processo corrosivo.

Com relação ao parâmetro da C_{DCE} pode-se notar que houve uma diminuição dos valores comparando-os com o valor do ensaio biótico. Esse resultado sugere que houve formação de produtos de corrosão com menor condutividade daqueles formados no meio sem a adição de biocida (FONSECA,

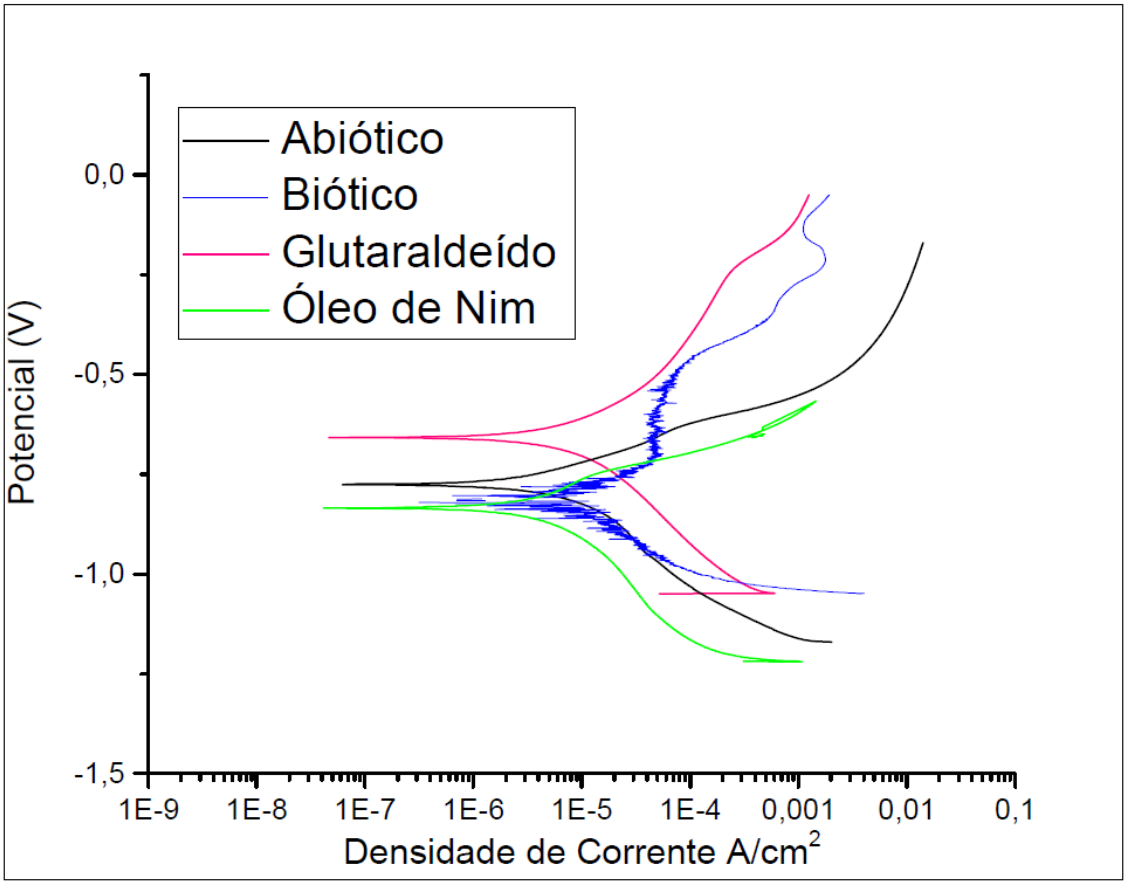
2018). Também é importante ressaltar que o deslocamento dos ângulos de fase para maiores valores de frequência (Figura 28 C), além da redução dos valores de C_{DCE} para os sistemas contendo qualquer um dos biocidas estudados, podem estar relacionados com o fato de não ter sido formado biofilme da superfície do aço, além da presença de um produto de corrosão ou um filme/película protetor pouco condutor, dificultando o processo de transferência de carga (BAYOUDH et al., 2008).

Comparando os resultados dos dois biocidas, pode-se verificar uma redução no valor de R_{tc} no ensaio com adição do óleo de nim assim como um aumento da C_{DCE} quando comparado com o ensaio com glutaraldeído. Além disso, a curva no gráfico de |Z| apresentada na Figura 28 B mostra um deslocamento para maiores valores de frequência no ensaio com glutaraldeído. Esses resultados indicam que este biocida conferiu uma proteção maior ao material quando comparado com o óleo de nim. Fonseca (2018) também observou um maior valor de C_{DCE} para ensaio com óleo de nim (4% m/v) quando comparado com glutaraldeído (0,01% m/v) na avaliação desses biocidas na biocorrosão de aço carbono 1020 influenciada por BRS em meio de água do mar artificial, sugerindo que o biofilme formado com o óleo de nim possui maior condutividade.

3.1.3.2.3 Polarização potenciodinâmica

A Figura 30 mostra as curvas de polarização potenciodinâmica catódicas e anódicas para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para os ensaios na ausência e na presença de BRS, bem como os ensaios após a adição dos biocidas no tempo de incubação do corpo de prova em 14 dias. Os parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel são apresentados na Tabela 12.

Figura 29 - Curvas de polarização potenciodinâmica para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ para os ensaios na ausência e na presença de BRS bem como os ensaios após a adição dos biocidas no tempo de incubação do corpo de prova em 14 dias



Fonte: O autor, 2020.

Tabela 13 - Parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel para o aço carbono 1020 em meio de água de *sprinkler* industrial com 0,2 mol L^{-1} de $NaNO_3$ em meio abiótico, biótico e após a adição de biocidas para o tempo de imersão do corpo

	Abiótico	**Biótico**	**Glutaraldeído**	**Óleo de Nim**
j_{corr} (μA/cm²)	2,25	3,43	1,94	$6,17 \times 10^{-3}$
β_c (V/dec)	0,094	0,067	0,034	0,026
β_a (V/dec)	0,064	0,083	0,032	0,028
E_{corr} (V)	-0,76	-0,81	-0,66	-0,83

j_{corr}: densidade de corrente de corrosão; β_c: coeficiente de tafel catódico; β_a: coeficiente de Tafel anódico; E_{corr}: Potencial de corrosão.

Fonte: O autor, 2020.

Observando a Figura 30 e os valores da Tabela 12 verifica-se que a adição de glutaraldeído deslocou o potencial de corrosão para um valor mais positivo e o valor da densidade de corrente de corrosão diminuiu, indicando uma redução do processo corrosivo, confirmando os resultados encontrados no ensaio de EIE. O valor do potencial de corrosão encontrado com a adição de óleo de nim foi bem próximo ao do ensaio biótico sem a adição de biocidas. Porém, a adição do óleo de nim ao meio causou uma redução na densidade de corrente de corrosão, indicando assim uma redução do processo corrosivo, quando comparado ao ensaio na presença de BRS, sem biocidas.

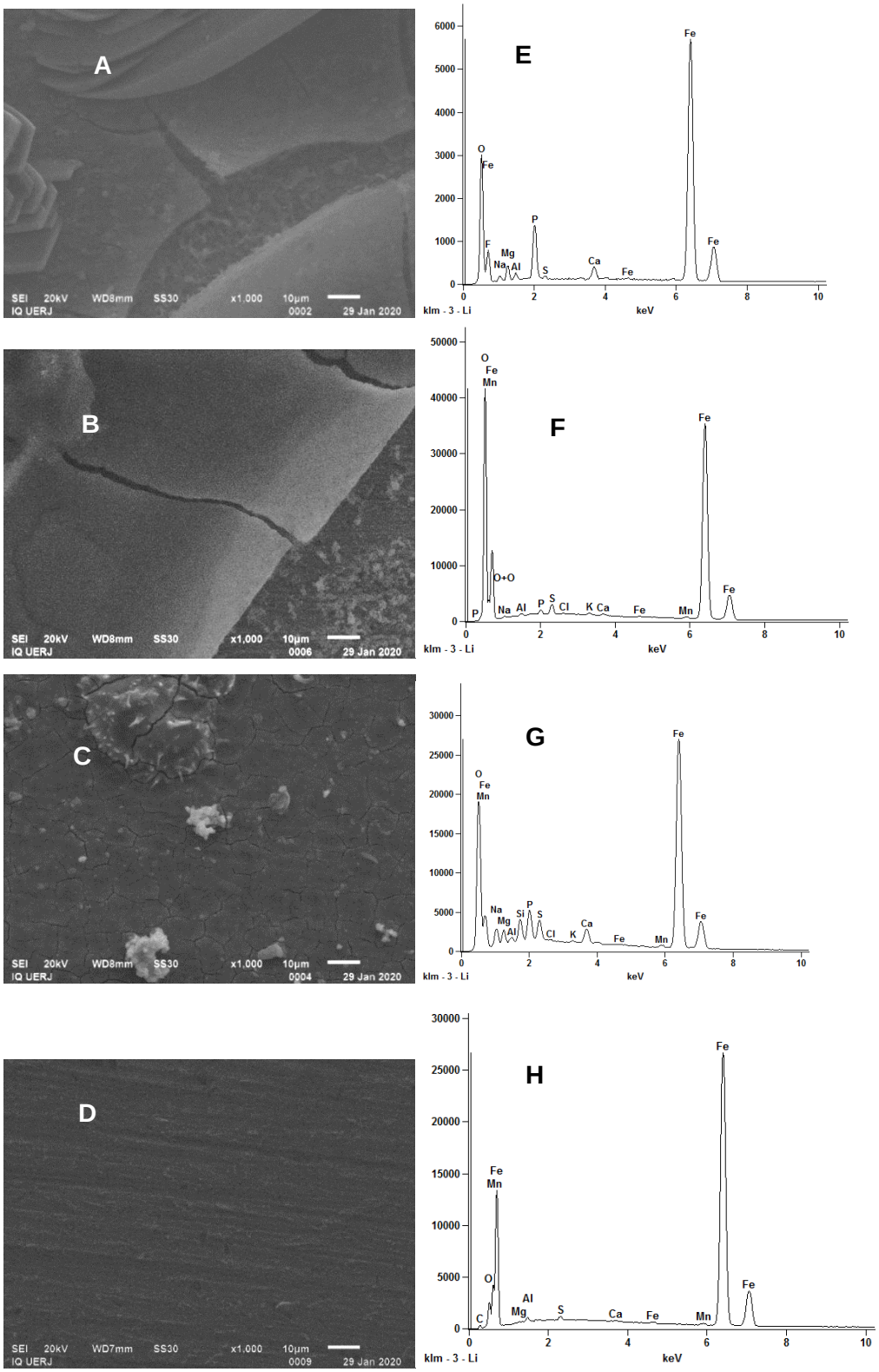
Ambos os biocidas apresentaram uma redução no valor de j_{corr}, indicando uma redução do processo corrosivo. As alterações nos valores de β_a e β_c nos ensaios com biocidas, em comparação com o ensaio biótico, apontam alterações nas semirreações anódicas e catódicas, sugerindo uma redução no processo corrosivo.

3.1.3.2.4 Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

Os ensaios de MEV e EDS foram realizados para o tempo de incubação do corpo de prova de 14 dias baseado na quantificação microbiana e nos resultados dos ensaios eletroquímicos como explicado anteriormente.

A Figura 31 mostra as micrografias obtidas do corpo de prova de aço carbono 1020 em meio na ausência e na presença de uma cultura de BRS, assim como em meio contendo o biocida glutaraldeído (50 ppm) e biocida óleo de nim (3 % v/v). Também são mostrados os resultados da análise de EDS para cada condição mencionada. Os biocidas foram adicionados ao meio antes da inoculação com a cultura de BRS.

Figura 30 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020 com aumento de 1000x após 14 dias de incubação em meio abiótico (A), biótico (B), contendo glutaraldeído (C) e contendo óleo de nim (D) e as respectivas análises de EDS sendo o meio abiótico (E), biótico (F), contendo glutaraldeído (G) e contendo óleo de nim (H)



Fonte: O autor, 2020.

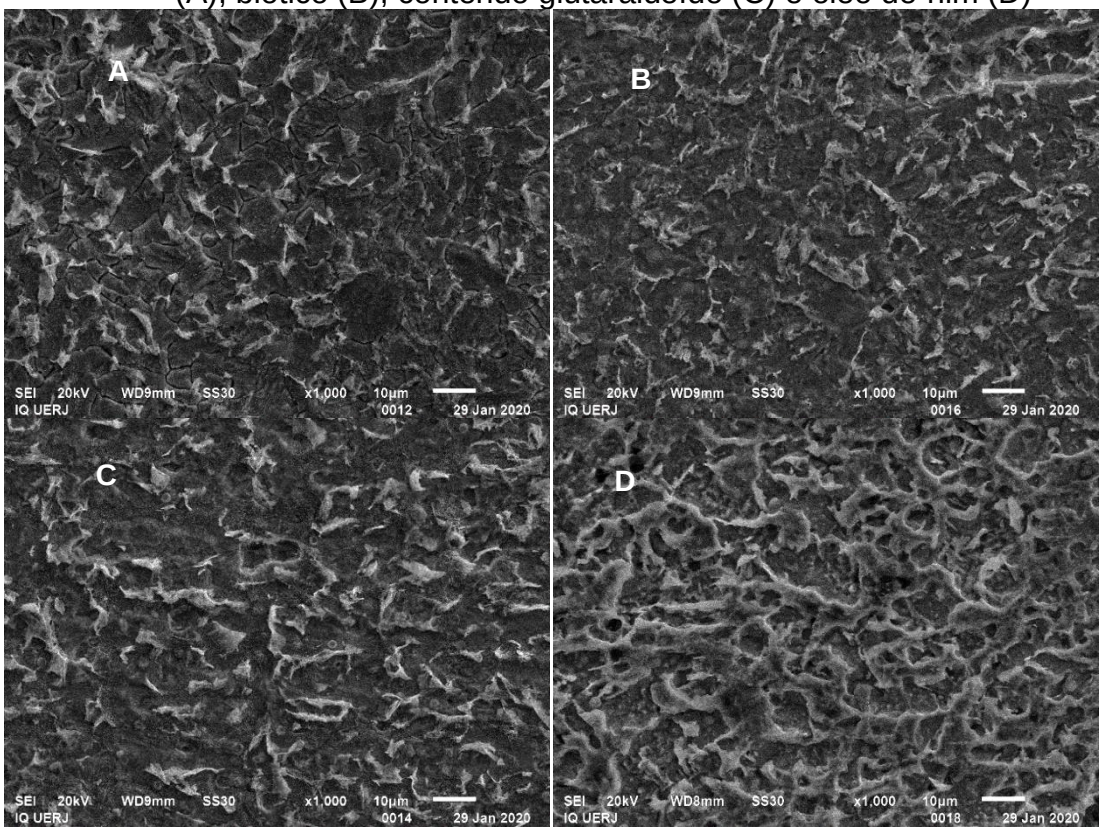
Pode-se observar a formação de produtos de corrosão tanto no meio abiótico (Figura 31 A) quanto no biótico (Figura 31 B), sendo que neste meio, a imagem indica uma provável presença de microrganismos sob os produtos de corrosão. Na Figura 31 C, meio contendo o biocida glutaraldeído, verifica-se a presença de um aglomerado celular com distribuição não uniforme na superfície do material, podendo ser atribuído a outros tipos de células que não foram quantificadas. Já na Figura 31 D, pode ser observada uma superfície homogênea do corpo de prova avaliado, além da ausência de aglomerado celular. Segundo Bhola et al. (2014), o óleo de nim confere proteção ao material pelo seu efeito bactericida, inibindo o crescimento celular, e também pela adsorção das moléculas orgânicas presentes no óleo na superfície do material, formando um filme e, dessa maneira, impedindo a colonização de bactéria.

A análise de EDS revelou uma maior concentração de enxofre, oxigênio e ferro (maior contagem) no ensaio biótico (31F) quando comparado com os ensaios abiótico (31E) e biocidas (31G e 31H). Isso provavelmente ocorreu devido aos produtos de corrosão formados na superfície do material exposto ao meio contendo BRS e sem biocidas. A presença de enxofre pode ocorrer pela formação de FeS, tendo em vista a coloração preta e o odor característico de H_2S nos biorreatores dos ensaios contendo BRS. Os íons Fe^{2+} que são produzidos na reação anódica do aço reagem com os íons S^{2-} metabolizados pelas BRS, produzindo sulfetos de ferro (FeS_x) (CETIN; AKSU, 2009).

A presença de Mn nas figuras 31 F, G e H está relacionada, provavelmente, aos constituintes do aço (BHOLA et al., 2014). Compostos a base de P presentes no meio de crescimento e o metabolismo das BRS e formação de biofilme podem justificar o pico de P observado nas figuras 31E, 31F e 31G (BHOLA et al., 2014).

A Figura 32 mostra as micrografias obtidas dos corpos de prova após a decapagem do material para a remoção do biofilme e dos produtos de corrosão de modo a ser possível uma verificação do ataque ao substrato.

Figura 31 - Micrografias da superfície do aço carbono 1020 com aumento de 1000x em 14 dias de ensaio, após a decapagem em meio abiótico (A), biótico (B), contendo glutaraldeído (C) e óleo de nim (D)



Fonte: O autor, 2020.

A análise da figura revela que não houve diferença significativa entre as condições de ensaio, provavelmente pelo tempo longo de decapagem do material, que foi de 4 minutos. Em todas as imagens pode ser observada a corrosão generalizada e uma provável formação de pites.

CONCLUSÕES

- No presente estudo foi possível, a partir da detecção da presença de BRS em água utilizada nas tubulações de aço carbono do sistema de *splinkler* de uma indústria farmacêutica localizada no Rio de Janeiro, avaliar o processo que leva ao estabelecimento da corrosão microbiologicamente induzida do material no meio estudado.
- A quantificação microbiana mostrou que o crescimento de BRS aderidas ao corpo de prova foi pequeno devido à baixa concentração de sulfato no meio estudado. Além disso, o valor máximo de células/cm^2 ocorreu em 14 dias e foi de 5,6 células/cm^2;
- O potencial de circuito aberto foi deslocado para valores de potencial de corrosão mais positivos em todos os tempos de ensaio na presença de BRS, confirmando o fenômeno e enobrecimento devido à formação de biofilme na superfície do aço carbono 1020, que já é conhecido pela literatura;
- Os ensaios eletroquímicos, juntamente com a análise de MEV permitiram identificar a formação de um biofilme na superfície do aço carbono 1020 com distribuição não uniforme em meio contendo BRS. Esse biofilme acelera o processo corrosivo causando corrosão localizada. A presença desse biofilme ocasiona um “bloqueio” parecendo estar protegendo o material. Porém, nos diagramas de |Z|, fase e nos ensaios de polarização potenciodinâmica foi possível observar a aceleração do processo corrosivo;
- Os resultados dos ensaios eletroquímicos na presença dos biocidas, sugeriram uma diminuição do processo corrosivo, sendo o glutaraldeído o mais efetivo;
- As imagens de MEV mostraram a presença de produtos de corrosão nos ensaios abióticos e bióticos, sendo este último apresentando também a presença de microrganismos sob os produtos de corrosão. A superfície do corpo de prova contendo glutaraldeído apresentou um aglomerado celular co distribuição não uniforme e o corpo de prova incubado em meio contendo óleo de nim apresentou uma superfície homogênea;

- As análises de EDS indicaram uma maior concentração de enxofre, oxigênio e ferro no ensaio biótico quando comparado com os ensaios abióticos e biocidas, provavelmente devido a formação de produtos de corrosão na superfície do corpo de prova na presença de BRS, sem biocida e da formação de FeS.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o comportamento das BRS nas células planctônicas;
- Quantificar outros microrganismos que contribuem para CMI, como bactérias produtoras de ácido;
- Fazer a análise de MEV e EDS nos outros tempos de ensaio;
- Avaliar o comportamento de outros biocidas naturais no tratamento de águas naturais;

REFERÊNCIAS

ALABBAS F.M. et al. Electrochemical characterization of microbiologically influenced corrosion on linepipe steel exposed to facultative anaerobic desulfovibrio sp. *International Journal of Electrochemical Science*, Joanesburgo, na África do Sul, v.8, p. 859–871, 2013.

ALABBAS, F.M. et al. Microbial Corrosion in Linepipe Steel Under the Influence of a Sulfate-Reducing Consortium Isolated from an Oil Field. *Journal of Materials Engineering and Perform*ance, Madison, Estados Unidos, v. 22, n. 11, p. 3517-3529, 2013.

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

ARAÚJO, L. et al. Efeito de Biocidas na Corrosão Induzida Microbiologicamente do Aço Duplex em Água de Produção de Petróleo. *Corrosão e Proteção de Materiais*, Rio de Janeiro, Brasil, v. 32, p. 108-114, 2013.

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

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

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

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

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms: current understanding and state-of-the art methods of study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Oxford, Inglaterra, v. 53, n. 3, p. 177-183, 2004.

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

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

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

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

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

CETIN, D.; AKSU, M, L**.** Corrosion behavior of low-alloy steel in the presence of Desulfotomaculum sp. *Corrosion Science*, Oxford, Inglaterra, v 51, p. 1584-1588, 2009.

CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. Biofilms. John Wiley & Sons, Nova York, Estados Unidos, p. 796, 1990.

CHARTIER, D. Controling Microbiollogically Influenced Corrosion in Fire Sprinkler Systems. *Fire Protection Contractor magazine*, 2004.

CHEN, S.; WANG, P.; ZHANG, D.; Corrosion Behavior of Copper Under Biofilm of Sulfate-Redicing Bacteria. *Corrosion Science*, Oxford, Inglaterra, v. 87, p. 407-415, 2014.

CHITRA S. et al. A review on microbial mediated corrosion on mild steel by inactivating the extracellular polysaccharide secreted by aerobic/anaerobic microorganism. *Chemical Science Review and Letters*, Zhenjiang, China, v.3, p. 56-62, 2014.

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

DEXTER, S. C.; LAFONTAINE, J. P. Effect of Natural Marine Biofilms on Galvanic Corrosion. *Corrosion Science Section*, Califórnia, Estados Unidos, v. 54, n. 11, p. 851-861, 1998.

CHOI D.J.; YOU S.J.; KIM J.G. Development of an environmentally safe corrosion, scale, and microorganism inhibitor for open recirculating cooling systems. *Materials Science Engineering*, Coréia do Sul, v. 335, p. 228–236, 2002.

EAGAR, R.G.; LEDER, J; THEIS, A.B. Glutaraldehyde: factors important for microbiocidal efficacy. *Unidos 3 rd Conference on Progress in Chemical Disinfection*, Nova York, Estados, 1986.

ENNING D.; GARRELFS J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, Estados Unidos, v.80, p. 1226-1236, 2014.

FERREIRA, D.G. *Avaliação de Proantocianidinas Extraídas da Fibra Do Coco (Cocos nucifera L.) Como Biocida e Inibidor de Corrosão*. 2018. 124f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

FONSECA, R.S. *Avaliação de biocidas naturais no controle da biocorrosão em aço carbono 1020 por Bactérias Redutoras de Sulfato***.** 2018.102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

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

GEESEY G.G. Biofilm Formation. In: Kobrin G. A Pratical Manual on Microbiologically influenced Corrosion. *NACE Internacional*, Texas, Estados Unidos, 1993.

GENTIL, V. *Corrosão*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora S.A, 2007.

GENTIL, V. *Corrosão*. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora S.A, 2011.

GEORGE, R. P.; MARSHALL, D.; NEWMAN, R. C. Mechanism of a MIC probe. *Corrosion Science*,Oxford, Inglaterra**,** v. 45, n. 9, p. 1999-2015, 2003.

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

GONÇALVES, M. M. M. *Remoção de metais pesados de efluentes em biorreator anaeróbio empregando fontes de carbono alternativas*. 2001. 163f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

GONÇALVES, N. J. *Potencialidade do Tratamento por Choque com Biocidas na Remoção e/ou Formação de biofilme*. 2002. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

HARRIGAN, W. F; McCAMCE, N. E. Laboratory methods in microbiology*. Academic Press*, Massachusetts, Estados Unidos , 1977.

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

HIRSCHORN, B. et al. Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters. *Electrochimica Acta*, Oxford, Inglaterra:, v. 55, n. 21, p. 6218-6227, 2010.

HUTTUNEN-SAARIVIRTA, E. et al. Ennoblement, corrosion, and biofouling in brackish seawater: comparison between six stainless steel grades. *Bioelectrochemistry*, Bielefeld, Alemanha, v. 120, p. 27-42, 2018.

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

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

JIA, R. et al. Enhanced Biocide Treatments with D-amino Acid Mixtures against a Biofilm Consortium from a Water Cooling Tower. *Frontiers in Microbiology*, Fermoy, Irlanda**,** v. 8, p. 1538, 2017.

JIA, R. et al. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Shantou, China**,** v. 137, p. 42-58, 2019.

JIN J.; WU G.; GUAN Y. Effect of bacterial communities on the formation of cast iron corrosion tubercles in reclaimed water. *Water Research*, Dübendorf, Suíça, v. 71, p. 207–218, 2015.

KUROSE, K.; YATAGAI, M. 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*, Quioto, Japão, v. 51, p. 185-188, 2005.

LANDOULSI J.; COOKSEY K.E.; DUPRES V**.** Review – interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion. *Biofouling*, Buckingham, Inglaterra, v.27, p. 1105–1124, 2011.

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

LIN, W.W. et al. Study on Corrosion Inhibition of Glutaraldeyde for 304 Stainless Steel in Simulated Cooling Water Contaning Sulfate-Reducing Bacteria. *Advanced Materials Research*, Hawthorn, Austrália. v 785-786, p. 38-41, 2013.

LIU, H. et al. Corrosion behavior of carbon steel in the presence of sulfate reducing bacteria and iron oxidizing bactéria cultured in oilfield produced water. *Corrosion Science*, Oxford, Inglaterra, v.100, p.484–495, 2015.

LIU T. et al. Marine bacteria provide lasting anticorrosion activity for steel via biofilm-induced mineralization. *Applied Materials & Interfaces*, Washington, Estados Unidos, v. 10, p. 40317-40327, 2018.

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

LOTO, C. A. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact—a review. The *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, Singapura, Ásia**,** v. 92, n. 9-12, p. 4241-4252, 2017.

LV, M.; DU, M. A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, Holanda**,** v. 17, n. 3, p. 431-446, 2018.

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

MADIGAN, M.T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARQUIS F.D.S. Strategy of macro and microanalysis in microbial corrosion. In: Sequeira, C.A.C.; Tiller, A.K. (eds.). *Microbial Corrosion-1*. Londres: Elsevier Applied Science, 1989. p. 125–151.

MARTINEZ, S. S. (Ed.). *O nim* – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção. 2. ed. Londrina, Paraná: IAPAR, 2011.

MC BETH J.M.; Emerson D. In situ microbial community succession on mild steel in estuarine and marine environments: exploring the role of iron-oxidizing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, Fermoy, Irlanda**,** v. 7, p. 767–780, 2016.

MC BETH, J.M. et al. Neutrophilic iron-oxidizing ‘‘zetaproteobacteria’’ and mild steel corrosion in nearshore marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, Estados Unidos, v. 77, p. 1405–1412, 2011.

MOON, K.M. et al. Electrochemical analysis of the microbiologically influenced corrosion of steels by sulfate-reducing bacteria. *Metals and Materials International*, Pohang, Coreia do Sul, v.13, p.211–216, 2007.

MORADI, M. et al. De-alloying of 316 stainless steel in the presence of a mixture of metal-oxidizing bacteria. *Corrosion Science*, Oxford, Inglaterra, v.53, p.4282–4290, 2011.

NARENKUMAR, J. et al. Ginger extract as green biocide to control microbial corrosion of mild steel. *3 Biotech*, Berlin, Alemanha, v. 7, p. 133, 2017.

NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A. Prospecção do cultivo do nim (*Azadirachta indica*) no Brasil. *Embrapa Florestas*, Colombo, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/657534>. Acesso em 06 de fevereiro 2020.

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

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

PAULUS, W. *Microbicides for the Protection of Materials*. A Handbook. London, UK, Chapman & Hall, 1993.

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

PEREIRA, M.O.B.O.; *Comparação da Eficácia de dois Biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em Sistemas de Biofilme*. 2001. 234f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) Universidade do Minho, Braga, 2001.

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

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

RUSSEL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. Internacional. *Biodeterioration & Biodegradation*, Shantou, China, v. 36, p. 247-265, 1995.

SADIKI, M. et al. The impact of Thymus vulgaris extractives on cedar wood surface energy: theoretical and experimental of Penicillium spores adhesion. *Industrial Crops and Products*, Montana, Estados Unidos, v.77, p.1020–1027, 2015.

SAND W.; GEHRKE T. Microbially influenced corrosion of steel in aqueous environments. *Environmental Science and Biotechnology*, Delft, Holanda, v.2, p.169–176, 2003.

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

SILVA, L.M*. Introdução da análise de sistemas eletroquímicos no domínio da frequência*. Apostila. 2008. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.

SILVA, P. S. D. *Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutores de sufato*. 2015. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Químca) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

STAROSVETSKY J. et al. Electrochemical behaviour of stainless steels in media containing iron-oxidizing bacteria (IOB) by corrosion process modeling. *Corrosion Science*, Oxford, Inglaterra**,** v.50, p. 540–547, 2008.

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

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

STETTER K.O. et al. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. Nature, Londres, v. 365, p. 743–745, 1993.

SU, W.; TIAN, Y.; PENG, S. The influence of sodium hypochlorite biocide on the corrosion of carbon steel in reclaimed water used as circulating cooling water. *Applied Surface Science*, Breda, Países Baixoa**,** v. 315, p. 95-103, 2014.

SUTTON, S. The most probable number method and its use in QC microbiology. *Journal of GXP Compliance Autumn*, v.14, p.28, 2010. Disponível em: < http://go.galegroup.com.ez83.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?id=GALE%7CA243459134&v=2.1&u=capes&it=r&p=AONE&sw=w&asid=0b6ed37891bb284658b40ec0239e2d43> Acesso em: 01 fev 2020.

SWAROOP, B. S.; VICTORIA, S. N.; MANIVANNAN, 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*, Taiwan, China**,** v. 64, p. 269-278, 2016.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining

industries. *Biochemical Engineering Journal*, Lausana, Suíça, v. 44, p. 73–94, 2009.

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

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

WILLIAMSON et.al**.** Microbially influenced corrosion communities associated with fuel-grade ethanol environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 6945-6957, 2015.

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

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