

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO - PR**

**EFEITO DO *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* NA  
CORROSÃO DO AÇO 430**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRISCILA APARECIDA ANUNZIATO**

**GUARAPUAVA-PR**

**2008**

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

A636 Anunziato, Priscila Aparecida  
Efeito do *Thiobacillus Thiooxidans* na corrosão do aço 430./ Priscila Aparecida  
Anunziato. -- Guarapuava, 2008  
ix, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Química Aplicada, 2008

Orientador: Paulo Rogério Pinto Rodrigues

Co-orientadora: Cynthia Furstenberger

Banca examinadora: Isolda Costa, Fauze Jacó Anaissi, Paulo Rogério Pinto  
Rodrigues

Bibliografia

1. Corrosão microbiológica. 2. Aço inoxidável 430. 3. *Thiobacillus  
Thiooxidans*. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada .

CDD 542

**PRISCILA APARECIDA ANUNZIATO**

**EFEITO DO *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* NA CORROSÃO DO AÇO 430**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues

Orientador

Cynthia Furstenberger

Co - orientadora

GUARAPUAVA-PR

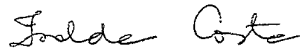
2008

**PRISCILA APARECIDA ANUNZIATO**

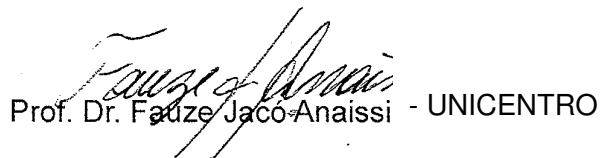
**EFEITO DO *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* NA CORROSÃO DO AÇO 430**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada para obtenção de título de Mestre.

Aprovada em 15 de dezembro de 2008.



ProF. ora. Isolda Costa - IPEN/CNEN



Prof. Dr. Faúze Jacó Anaissi - UNICENTRO



Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues  
Orientador

GUARAPUAVA-PR  
2008

“A humildade nos ajuda a reconhecer esta coisa óbvia: ninguém sabe tudo; ninguém ignora tudo. Todos sabemos algo; todos ignoramos algo. Sem humildade dificilmente ouviremos com respeito a quem consideramos demasiadamente longe de nosso nível de competência.”

Paulo Freire

## AGRADECIMENTOS

Vitoriosa com a luz e sabedoria que me deste, agradeço a Deus por confiar em mim. Nos momentos de certeza ou dúvida, pude sentir Tua mão na minha a me guiar.

A meu querido orientador professor Dr Paulo Rogério Pinto Rodrigues, que com suas palavras me fez refletir e buscar um ideal. As alegrias de hoje também são suas, pois seu carinho, estímulo, confiança e compreensão são a alma desta vitória. Você foi Professor, meu mestre, mas acima de tudo, foi meu amigo, meu guia, meu anjo da guarda.

Agradeço a minha querida mãe Isabel. É mãe, quantas e quantas vezes, motivada por minha fragilidade tive intenção de parar e desistir. Mas, amparada por você, concluímos, hoje, mais uma etapa de nossas vidas. Você foi presença em solidão, sua companhia, seu sorriso, suas palavras, foram expressões de amor profundo. Se a senhora se orgulha de ser minha mãe, eu me orgulho muito mais de ser sua filha.

A você Pai (in memorian)...Agora me lembro de você, e tenho certeza de que você está compartilhando a felicidade da minha vitória. Posso sentir você me abraçando. Você estará sempre comigo. Mesmo que tenhamos sido privados dos beijos, olhares, abraços, carinho, o amor subsiste!

Agradeço também a meu companheiro Eduardo por todas aquelas vezes que me ouviu e me deu apoio. Nos méritos de minhas conquistas, há muito de sua presença.

Agradeço minha irmã Fabiola, meu cunhado Vilson que estiveram comigo nos momentos mais difíceis desta caminhada, que sofreram a minha ausência quando o dever e o estudo me chamaram, que compreenderam as minhas “falta de tempo”, minha tensão durante as provas, meu nervosismo. O meu sorriso e o meu obrigada! Na validade dessa luta, nos méritos desta conquista, há muita presença de vocês.

A meu querido sobrinho Mateus que sendo apenas uma criança ficava quietinho do meu lado falando que estava olhando a Dada (é assim que ele me chama) estudar.

A professora Doutora Isolda Costa pelas análises por MEV.

Não posso deixar de agradecer também a minha co-orientadora Professora Dra Cynthia, as minhas colegas Rebeca e Martha que doaram um pouco do seu tempo a me dar atenção e ajudar quando precisei. Juntos nos completamos e trabalhamos melhor. Que fique aqui registrada minha carinhosa gratidão.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Símbolos e Abreviaturas</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	II
<b>Abstract</b> .....	III
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	4
2.1. Objetivo Geral .....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
<b>3. Referencial Teórico</b> .....	5
3.1. Materiais Ferrosos .....	5
3.2. Corrosão .....	7
3.3. Corrosão Microbiológica .....	9
3.4. Microorganismos .....	16
3.5. Estruturas das Bactérias.....	19
3.5.1. Tipos Nutritivos das Bactérias .....	27
3.5.2. Meios Bacteriológicos .....	28
3.5.3. Condições Físicas Necessárias ao Crescimento .....	30
3.5.4. Principais Grupos de Bactérias .....	32
3.5.5. Bactérias Patogênicas .....	33
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	36
4.1. Soluções Empregadas .....	36
4.2. Eletrodos .....	36
4.3. Células de Trabalho .....	36
4.4. Equipamentos .....	37
4.5. Temperaturas de Trabalho .....	37
4.6. Procedimento Experimental .....	37
4.6.1. Preparação dos Eletrodos de Trabalho .....	37

4.6.2. Análise Gravimétrica .....	38
4.6.3. Potencial de Circuito Aberto (Eca) .....	38
4.6.4. Polarização Potenciostática Anódica .....	38
4.6.5. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) .....	38
4.6.6. Análise Óptica .....	43
4.6.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	43
4.6.8. Caracterização do microorganismo .....	43
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>45</b>
5.1. Análise química do aço inoxidável ferrítico tipo ABNT 430 .....	45
5.2. Ensaios de identificação microbiológica .....	45
5.3. Ensaios gravimétricos e de microscopia óptica .....	47
5.4. Ensaios Eletroquímicos .....	54
5.5. Ensaios de microscopia eletrônica de varredura .....	60
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Anexos I .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>69</b>



**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

a.a.	aminoácidos
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BRS	Bactérias Redutoras de sulfato
<i>Cr</i>	Cromo
<i>E.C.</i>	Meio de cultura
<i>Eca</i>	Potencial de circuito aberto
<i>E<sub>corr</sub></i>	Potencial de corrosão
EDAX	Análise de Energia Dispersiva de Raios-X
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
<i>Fe</i>	Ferro
H <sub>2</sub> S	Gás sulfídrico
<i>j<sub>corr</sub></i>	Densidade de corrente de corrosão
J <sub>ox</sub>	Corrente de oxidação
J <sub>red</sub>	Corrente de redução
<i>m</i>	Microorganismo
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MnS	Sulfeto de Manganês
PAC	Polarização anódica cíclica
pH	Potencial hidrogeniônico
SRB	Bactérias redutoras de sulfato
TT	<i>Thiobacillus Thiooxidans</i>
PA	Anódica potenciostática
PC	Potenciodinâmica cíclica
MEV	Microscopia óptica e eletrônica de varredura
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica

## RESUMO

*Autores:* Priscila Aparecida Anunziato e Paulo Rogério Pinto Rodrigues

*Título da dissertação:* Estudo do Comportamento eletroquímico de microorganismos na oxidação do aço 430

É de conhecimento que metais imersos em sistemas aquosos são facilmente colonizados por microorganismos. Como consequência desta colonização, a superfície metálica se torna coberta por um biofilme. Estes Biofilmes microbianos são muito complexos devido as suas diferentes populações microbianas. Normalmente são em forma poliméricas separados por canais e espaços vazios, que se desenvolvem em praticamente todas a superfície metálica. Os acidentes mais graves ocorrem na biocorrosão de ambientes anaeróbios, como em solos e com espessos biofilmes. A corrosão microbiológica é um dos grandes problemas industriais da atualidade, dada a variedade de ambientes que podem apresentar colônias de bactérias, muitos são os equipamentos que podem sofrer esse tipo de corrosão. As indústrias petrolíferas e de álcool são as que mais sofrem com este tipo de oxidação. Existem poucos trabalhos na literatura que utilizam a bioeletroquímica como monitoramento ou ação protetora da superfície metálica. O objetivo deste trabalho é estudar a influência da *Thiobacillus Thiooxidans* (TT) na corrosão do aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1\text{mol L}^{-1}$ . Neste trabalho foram empregadas as técnicas de: medidas gravimétricas, polarização anódica potencioestática (PA) e potenciodinâmica cíclica (PC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV). Os resultados gravimétricos mostraram que em 180 minutos de imersão do aço no meio contendo TT há a formação de biofilme, o qual inicialmente bloqueia a corrosão do metal. A PA mostrou que o TT atua catalisando a reação de oxidação do aço 430 neste meio. Resultados semelhantes foram obtidos pela EIE. A aplicação da PC na região passiva do aço 430, neste meio, causa a inibição da geração de biofilmes em sua superfície, resultado este comprovado pela MEV.

**Palavras-Chave:** corrosão microbiológica, aço inoxidável 430, *Thiobacillus Thiooxidans*.

**ABSTRACT**

*Author`s:* Priscila Aparecida Anunziato and Paulo Rogério Pinto Rodrigues

*Title:* Study of electrochemical behavior of microorganisms in the oxidation of steel 430

It is known that metals immersed in aqueous systems are easily colonized by microorganisms. As a result of colonization of microorganisms in metal, the metal surface becomes covered with a biofilm. These microbial Biofilms are very complex due to their different microbial populations, usually in the form polymer separated by canals and empty spaces, which develop in virtually all the metal surface. The most serious accidents occur in biocorrosion of anaerobic environments, as in soil and thick with biofilms. The microbiological corrosion is a big problem of today , given the variety of environments that may have colonies of bacteria, many equipment that can suffer this type of corrosion. The oil and alcohol industries are the biggest sufferers with this type of oxidation. The objective of this work is the influence of *Thiobacillus Thiooxidans* (TT) in the corrosion of 430 stainless steel (SS) in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . In this study of the techniques were employed: measures of mass loss, cyclic potentiodynamic polarization (CPP) and potentiostatic anodic polarization (PAP), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), optical (OM) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that gravity in 180 minutes of immersion of steel in the solution containing TT there is the formation of biofilms, which initially blocks the corrosion of the metal. The PAP has shown that the TT works catalysing the reaction of oxidation of 430 SS in this solution, similar results were obtained by the EIS. The implementation of the CPP in the region passive steel 430, in this solution, inhibit the generation of biofilms on the surface, which was confirmed by SEM.

**Keywords:** Microbiological corrosion , 430 Stainless Steel, *Thiobacillus Thiooxidans*.

## 1. INTRODUÇÃO

A adição de elementos de liga (ex. carbono e cromo) ao ferro, pode gerar algumas ligas ferrosas como [1]:

Aços : Ligas de ferro - carbono, com teor de carbono inferior a 2,1%;

Ferros Fundidos : Ligas de ferro - carbono com teor de carbono superior a 2,1 %;

Aços inoxidáveis : Adição de no mínimo 10 % de Cr, com ou sem adição de outros elementos.

De acordo com esta classificação, os aços inoxidáveis são ligas de ferro (Fe) e cromo (Cr) com um mínimo de 10 % de Cr e a adição de outros elementos, os quais permitem a obtenção de uma extensa classificação do tipo de aço inoxidável (ex.: séries 300, 400, duplex, etc) e conseqüentemente diferentes aplicações [1-2].

Os aços inoxidáveis também são caracterizados por uma elevada resistência à corrosão, mas dependendo do ambiente ao qual estarão sujeitos, poderão corroer. Assim apesar de serem classificados como “inoxidável”, esta classificação pode-se tornar irreal para este tipo de aço [3].

A classificação dos aços inoxidáveis é dividida em dois grandes grupos: 400, 300. A série 300 engloba os aços inoxidáveis austeníticos, não magnéticos e com estrutura cúbica de face centrada, são basicamente ligas Fe, Cr e Ni. A série 400 é a dos aços inoxidáveis ferríticos, aços magnéticos com estrutura cúbica de corpo centrado, basicamente ligas de Fe e Cr, esta série pode ser dividida em: ferríticos e martensíticos [3].

O aço utilizado nesse trabalho foi o aço inoxidável ferrítico 430. Este possui quantidade superior a 16% de cromo. É um material com ótima resistência à corrosão e uma boa capacidade de estampagem, utilizado na fabricação de talheres, pias, fogões etc [4].

Nota-se que a corrosão é um importante tópico científico e tecnológico de estudo dos aços inoxidáveis, principalmente quando esta corrosão é provocada por microorganismos [5].

Os microorganismos induzem, aceleram ou mantêm a reação de corrosão, em uma interface metal/solução, biologicamente condicionada pelos biofilmes [6]. Os mecanismos associados à corrosão microbiologicamente induzida se devem à presença física das células

microbianas na superfície do metal ou pelas suas próprias atividades metabólicas [7-13]. A corrosão microbiológica pode ocasionar uma passivação do metal base, causando uma minimização da velocidade de corrosão (*corrosão uniforme*) ou mesmo ocasionar uma espécie de *corrosão localizada (alveolar ou pite)*, seja por geração de uma oxidação mais intensa na parte inferior dos biofilmes devido à geração de meios ácidos ou mesmo por aeração diferencial [14].

Uma das alternativas é utilizar a biotecnologia para solucionar os problemas causados por microorganismos, como os que possuem a capacidade de formar biofilmes. Os micrororganismos apresentam uma imensa diversidade e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos [15-16]. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos [17].

Na década de 90, verificou-se que as bactérias em biofilme são metabólicas e morfologicamente diferentes das bactérias em suspensão e das isoladas em culturas puras, além de possuírem maior resistência a antibióticos e desinfetantes, também chamados de biocidas. Estima-se que mais de 90% dos micrororganismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias [18-20]. A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio, tais como a temperatura, minerais dissolvidos, pressão, pH e oxigênio dissolvido e não é necessariamente uniforme, podendo até englobar partículas sólidas (argilas, areias, partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde está imerso [19-21].

Em meios industriais, a formação de biofilmes pode levar a um processo de corrosão das ligas metálicas e polímeros e conseqüentemente, à obstrução de tubulações e à contaminação dos produtos finais [22].

O gênero *Acidithiobacillus sp* é composto por bactérias Gram negativas em forma de bastonete (~0,5 x 1,0-4,0µm) com algumas espécies móveis por meio de flagelos polares. Não possuem formas de resistência conhecidas, são capazes de obter energia através da catálise oxidativa de compostos sulfurados, utilizando o oxigênio como o último aceptor eletrônico. As bactérias do Gênero *Acidithiobacillus* são aeróbias, com crescimento ótimo em meio com pH ácido. Estas espécies são encontradas em diversos ambientes, como locais de mineração, rios com elevada carga de dejetos orgânicos, áreas de tratamento de esgoto e estuários, além

de estruturas da construção civil, provocando danos à mesma. A biodeterioração da qualidade da água, geração de ácido sulfúrico e a precipitação de óxidos de ferro são problemas sérios associados a estes microrganismos.

O enxofre elementar é um substrato essencial para as espécies *Acidithiobacillus sp* que permite a geração de ácido sulfúrico [23-24]. Nos aços inoxidáveis, a presença de MnS pode permitir a alimentação deste microorganismo, levando à geração de H<sub>2</sub>S que com a água produz o ácido sulfúrico. Este processo reduz o pH das superfícies metálicas permitindo a nucleação do biofilme. O *Thiobacillus Thiooxidans* são acidofílicos e crescem em pH 2 – 3. O ácido sulfúrico produzido por este microorganismo é agressivo e ataca a superfície metálica [23-25].

Neste trabalho irá observar que o *Thiobacillus Thiooxidans* além do pH 2 e 3 crescem também em pH = 0.

Na literatura são encontradas diversas propostas de criação de barreiras para se evitar a geração deste tipo de biofilmes. Barreiras estas entre o meio e o metal, são uma das soluções mais comum encontrada pela indústria de transporte e saneamento de águas residuais contra a corrosão microbiológica [26-28]. A pulverização com hidróxido de magnésio, também foi relatada com o intuito de se aumentar o pH da superfície [29]. Mais recentemente, o uso de biocidas tem sido investigado [30-31]. Entretanto deve-se ressaltar que o uso de biocidas é ecologicamente errado devido à contaminação do meio ambiente por espécies organocloradas ou fosforadas.

O objetivo deste trabalho é estudar o tipo de corrosão microbiológica provocada pelo *Thiobacillus Thiooxidans* no aço inoxidável 430 em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar a corrosão microbiológica provocada pelo *Thiobacillus Thiooxidans* no aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ .

### 2.1 Objetivos Específicos

- (1º) Caracterizar e classificar o tipo de corrosão microbiológica que o *Thiobacillus Thiooxidans* provoca no aço 430 em meio de ácido sulfúrico 1 mol  $\text{L}^{-1}$ ;
- (2º) Aplicar a polarização cíclica na tentativa de inibição do crescimento dos biofilmes de *Thiobacillus Thiooxidans* na superfície do aço 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ .

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

Esta revisão bibliográfica será minuciosa quanto ao aspecto dos microorganismos e minoritária quanto aos materiais ferrosos e os tipos de corrosão. Por se tratar da primeira dissertação em bioeletroquímica do grupo GPEL-UNICENTRO a intenção é de que a mesma sirva de referencial para os futuros alunos de iniciação científica, mestrados ou doutorandos.

#### 3.1 MATERIAIS FERROSOS

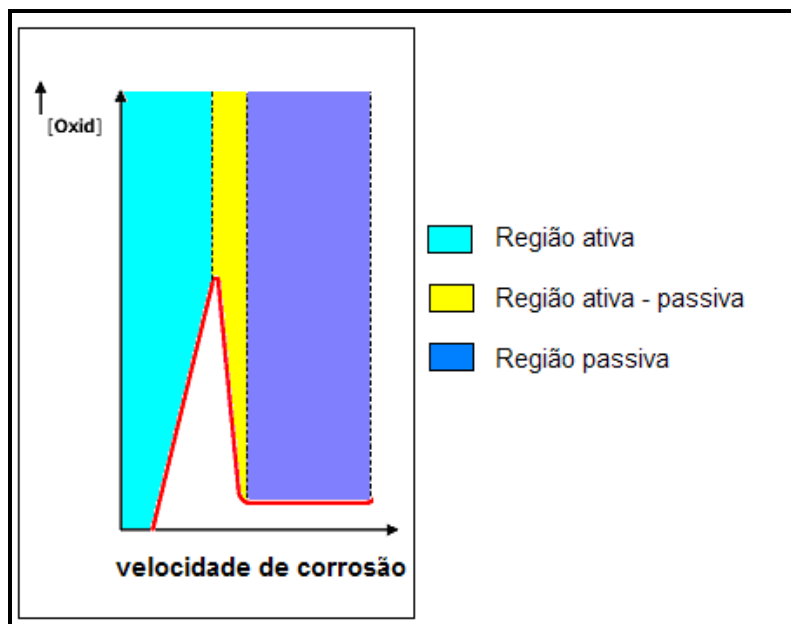
Os materiais ferrosos compreendem o ferro e suas ligas. Constituem cerca de 95% da produção mundial de metais.

Originalmente o aço foi obtido com a fundição do ferro, elemento químico abundante na natureza, que em alta temperatura se ligou ao carbono, originando o aço carbono ou ferro fundido.

O aço inoxidável originou-se por volta de 1912, através da adição de no mínimo 11% de cromo ao aço carbono, mas sua utilização na indústria só se intensificou na década de 50. Esta liga resultou em um aço de extremo brilho e beleza com a característica particular que deu origem a sua designação [1].

Uma camada passiva impermeabiliza a aço impedindo o contato do ferro com o oxigênio do ar, vide figura 3.1. Aparentemente, nos aços inoxidáveis, o filme passivo forma-se pela reação entre a água e o metal base, constituindo-se assim por um filme de oxihidróxido dos metais Cr e Fe. O filme passivo dos aços inoxidáveis é muito fino e aderente. Os filmes formados em meios oxidantes, como é o caso do ácido nítrico usado em banhos de decapagens, são os mais resistentes.





**Figura 3.1** – Diagrama representativo do efeito do aumento da concentração de oxidante [oxid.] na velocidade de corrosão dos aços inoxidáveis.

De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT, existem diferentes classificações para os aços inoxidáveis, tais como: austeníticos, ferríticos, martensíticos, duplex, especiais, etc [1-4, 32].

Os aços inoxidáveis de série 300 são os aços inoxidáveis austeníticos, aços não magnéticos com estrutura cúbica de face centrada e basicamente ligas de Fe – Cr - Ni. A série 400 é a dos aços inoxidáveis ferríticos, aços magnéticos com estrutura cúbica de corpo centrado e basicamente ligas de Fe-Cr.

Neste trabalho será empregado o aço inoxidável da série 400, especificamente o aço inoxidável ferrítico 430, desta forma dar-se-á uma pequena introdução sobre estes tipos de liga metálica.

O aço ferrítico 430 é um dos mais conhecidos, possui uma quantidade superior a 16% de cromo, a qual lhe confere uma ótima resistência à corrosão e uma boa capacidade de estampagem, por exemplo, na fabricação de talheres, baixelas, pias, fogões, moedas, etc.

A maior limitação para a utilização do aço 430 é a soldabilidade do mesmo. Ressalta-se que o aço 430 tem excelente propriedade para estampagem, o que o leva a ser utilizado em dutos das indústrias petrolíferas. Além de se verificar pela figura 3.2, que o aço 430 é a liga base de criação da série 410 S, muito utilizada em colunas de destilação. Estes fatores levaram

a escolha desta liga neste trabalho nos estudos de corrosão microbiológica, uma das mais prejudiciais a este tipo de indústria [2].

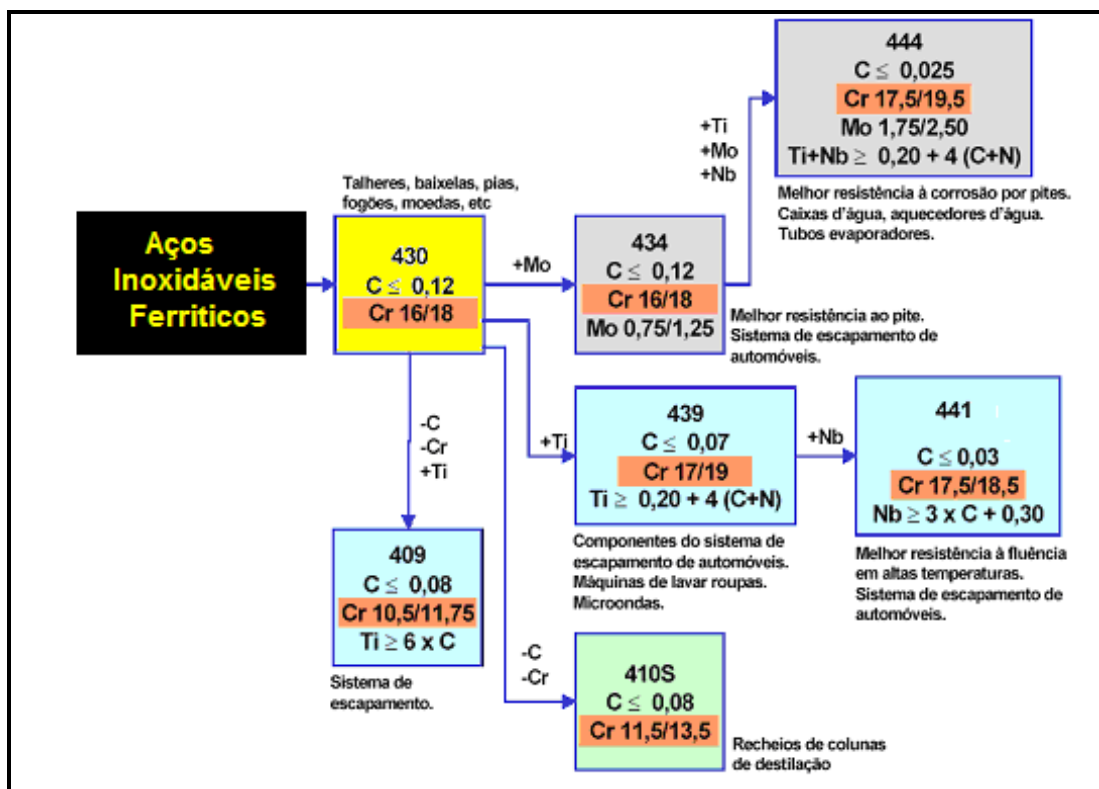


Figura 3.2 - Tipos de aços inoxidáveis ferríticos da série 400 [2].

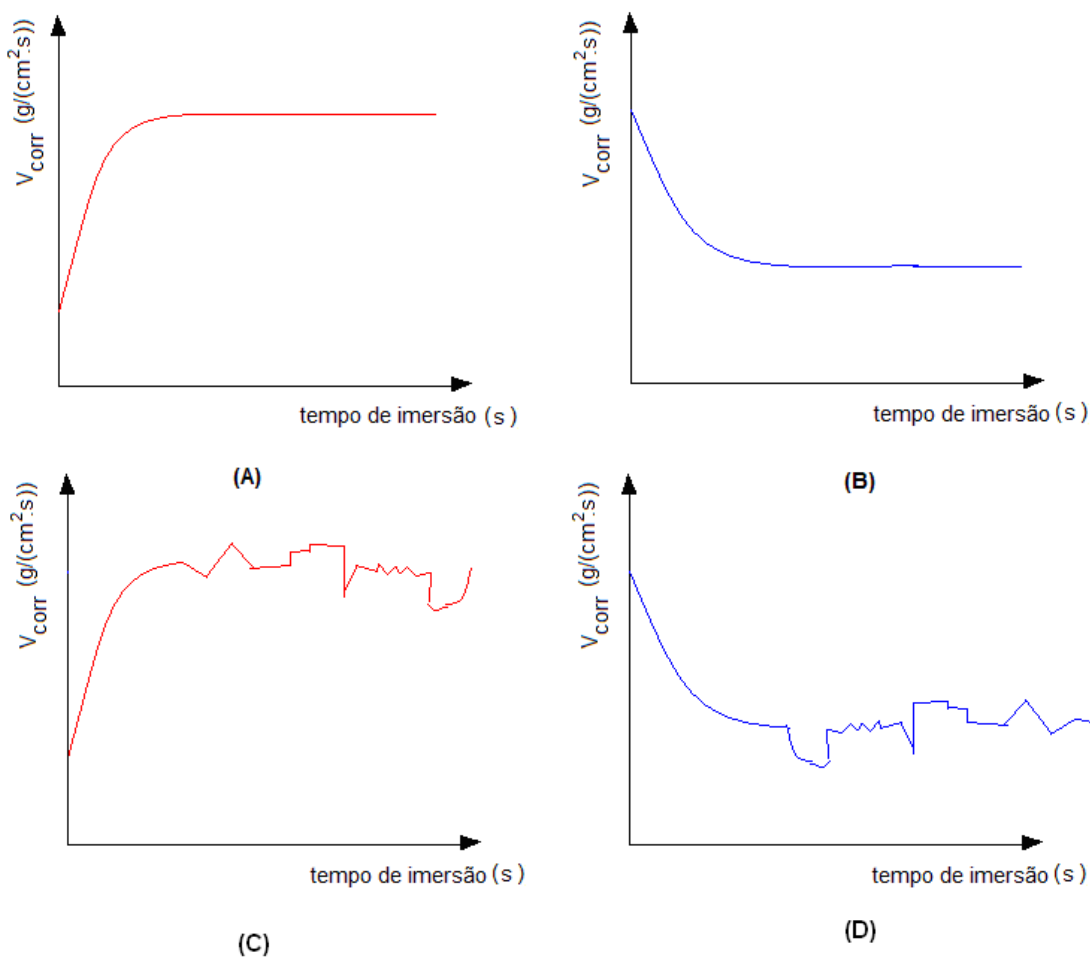
### 3.2 CORROSÃO

A corrosão metálica é a oxidação do material metálico, causada pela interação química ou eletroquímica a um determinado meio corrosivo (condutor), processo termodinamicamente espontâneo ( $\Delta G < 0$ ). Pode-se classificar a corrosão em dois tipos específicos:

(1ª) **Corrosão generalizada ou uniforme** – o metal em presença de meio oxidante, se oxida com perda de espessura uniforme, podendo possuir nos primeiros instantes uma velocidade de corrosão menor ou maior e depois de um certo tempo passar a ter uma velocidade de oxidação constante. Na figura 3.3 (a) e (b) são mostradas apenas duas esquematizações deste comportamento de corrosão uniforme [1-6, 33-36].

(2ª) **Corrosão localizada** - como a designação sugere, ocorre em determinados pontos da superfície metálica e é tão mais provável quanto maior a heterogeneidade da liga. Diversos tipos de corrosão localizada são abordados na literatura, entretanto para este trabalho será

abordado dois tipos clássicos, por Pite e Frestas [1, 14, 37]. Nas figuras 3.3 (c) e (d) são mostradas dois possíveis comportamentos da variação na medida da velocidade corrosão dentre os diversos existentes, quando a mesma ocorre de forma localizada.

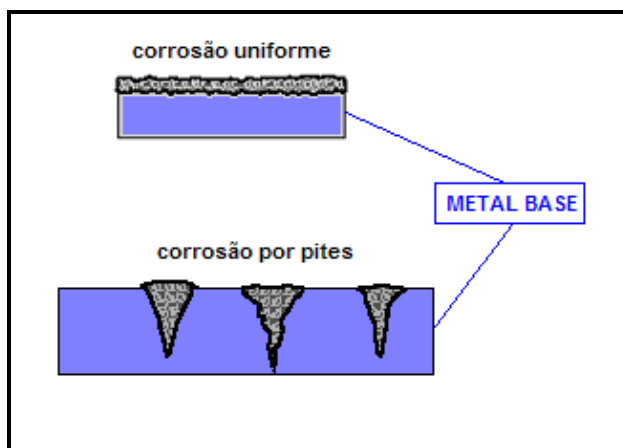


**Figura 3.3** – Esquematização de quatro possíveis medidas de velocidade de corrosão de um material metálico exposto a meio oxidativo, sendo:

- (A) Velocidade inicial menor e (B) velocidade inicial maior, quando comparadas à velocidade de estabilização devido à corrosão uniforme (generalizada).
- (C) Velocidade inicial menor e (D) velocidade inicial maior, quando comparadas à velocidade de pseudo-estabilização devido à corrosão localizada.

- Corrosão por Pite

O pite é uma forma localizada de corrosão que pode ocorrer como resultado da exposição do metal base em ambientes específicos, por exemplo, meios contendo cloretos [14,37]. Na maioria das aplicações, a extensão dos pites provavelmente é só superficial e a redução da secção de um componente é considerada desprezível, entretanto existem exemplos que a profundidade deste tipo de oxidação perfura o material base, provocando sérios danos [38-39]. Na figura 3.4 é possível se verificar e comparar à corrosão generalizada e a por pite, normalmente gerada em ligas passivadas, como aços inoxidáveis e alumínio.

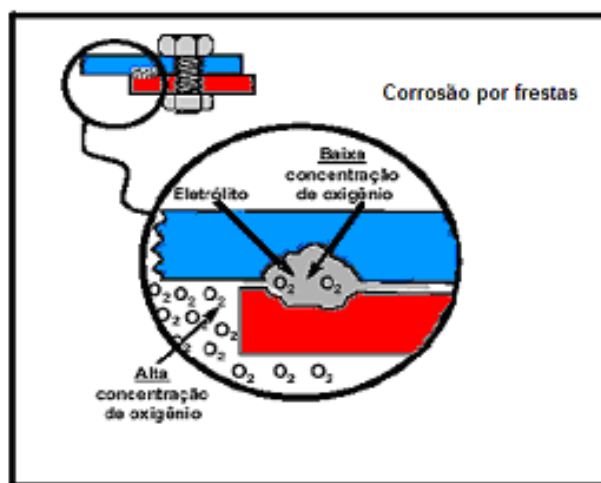


**Figura 3.4** – Representação esquemática da corrosão generalizada (uniforme) e a por pites

- Corrosão em frestas

Se há uma fresta na junção de duas peças de aço e o eletrólito e o oxigênio conseguem penetrar, forma-se uma célula de oxigenação diferenciada, esta diferença de concentração de oxigênio produz a corrosão por frestas, também chamada corrosão por aeração diferencial. Justamente onde a quantidade de oxigênio é menor, ou seja, no interior da fresta, por causa da dificuldade de acesso para o oxigênio, a área é anódica e o ferro passa para a solução na forma de íons. Este tipo de corrosão também é designado de corrosão por aeração diferencial. Na área externa, há maior concentração de oxigênio e água e por isso esta parte se

comporta como catodo e não sofre corrosão. Já na área intermediária, entre o anodo e o catodo há a formação da ferrugem, vide figura 3.5 [17,40].



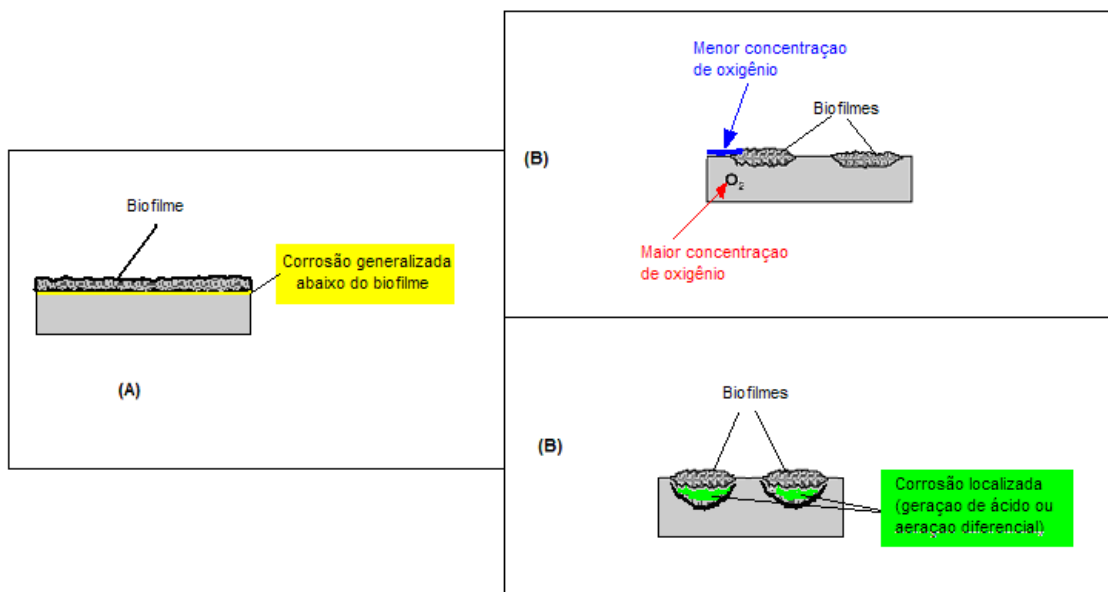
**Figura 3.5** – Representação esquemática da corrosão em frestas.

Após esta dissertação sobre os dois tipos de corrosão localizada deve-se ressaltar que um dos objetivos específicos deste trabalho é o estudo da *corrosão microbiológica* do aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , desta forma este será o próximo tópico a ser dissertado.

### 3.3 CORROSÃO MICROBIOLÓGICA

Os microorganismos induzem, aceleram ou mantêm a reação de corrosão, em uma interface metal/solução, biologicamente condicionada pelos biofilmes [6, 7, 14, 28, 38-43]. Os mecanismos associados à corrosão microbiologicamente induzida se devem à presença física das células microbianas na superfície do metal ou pela sua própria atividade metabólica. A corrosão microbiológica pode ocasionar uma passivação do metal base, causando uma minimização da velocidade de corrosão (*corrosão uniforme*) ou mesmo ocasionar uma espécie de *corrosão localizada (alveolar ou pite)*. Esta corrosão localizada pode ocorrer pela ruptura do biofilme ou pela “alimentação” dos microorganismos existentes nos mesmos,

podendo levar a uma oxidação mais intensa do metal, devido à geração de meios ácidos ou mesmo por aeração diferencial [41-42], vide figura 3.6.[14]



**Figura 3.6** – Esquemática da corrosão microbiológica em um material metálico exposto a meio oxidativo, onde ocorre uma corrosão generalizada (A) ou localizada (B).

De acordo com as características do crescimento e do metabolismo dos microorganismos, podemos citar os seguintes tipos de biocorrosão:

- Pilhas de aeração diferencial

Neste caso vários microorganismos como algas, bactérias e fungos formam depósitos insolúveis que ficam aderidos na superfície metálica sob a forma de biofilmes ou tubérculos. Abaixo desse depósito, pode ocorrer a corrosão por aeração diferencial ou o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, que também causarão corrosão no metal.

A área coberta pelo biofilme, ou seja, a área menos aerada, funcionará como anodo, provocando a oxidação do metal. Enquanto isso, a área limpa em contato com a água, será o catodo.

A área abaixo do biofilme, deficiente de oxigênio, favorece a proliferação de seres anaeróbios. Estabelece-se assim uma relação de simbiose entre bactérias aeróbias e anaeróbias sobre a superfície do metal.

- Corrosão por bactérias oxidantes de ferro

Essas bactérias, de grande diversidade estrutural, apresentam em comum a capacidade de oxidar o ferro ferroso a férrico, produzindo depósitos de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  ou  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , insolúveis. Entre as bactérias oxidantes de ferro normalmente associadas ao processo de corrosão, podemos citar os gêneros *Gallionella* e *Siderocarpa*. Essas bactérias desenvolvem-se em uma faixa de temperatura de 0 a 40°C e em valores de pH em torno de 5,5 e 8,2 [14].

- Corrosão por bactérias redutoras de sulfatos (BRS)

As BRS constituem um grupo taxonomicamente variado de bactérias, relacionadas por aspectos fisiológicos e ecológicos. Originalmente foram classificadas em dois gêneros: o *Desulfovibrio* (cinco espécies) e o *Desulfotomaculum* (sete espécies), segundo a capacidade de formar esporos, respectivamente [43].

O gênero *Desulfovibrio* consiste em um pequeno grupo de bactérias estritamente anaeróbias, que são caracterizadas pela sua capacidade de reduzir sulfato a sulfeto. O crescimento dessas bactérias depende de um pH normalmente entre 5,5 e 8,5, presença de sulfato e nutrientes, incluindo matéria orgânica e temperatura entre 25 a 44°C [44].

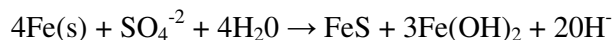
- Corrosão por bactérias oxidantes de enxofre

Trata-se de um grupo de bactérias do gênero *Thiobacillus* que oxidam enxofre ou compostos de enxofre a sulfato, com simultânea produção de ácido sulfúrico, que funciona como agente corrosivo. Os compostos de enxofre envolvidos são geralmente: sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) e diversos politionatos como o tetracionato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ).

As três espécies mais envolvidas nos processos de corrosão são: *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus concretivorus* e *Thiobacillus ferrooxidans*. Essas bactérias são químiolitotróficas, acidófilas, mesofílicas, aeróbias e autotróficas, sintetizando seu material celular de compostos inorgânicos e nitrogênio. A energia para essa síntese é proveniente da oxidação do enxofre, ou seus compostos. A temperatura ótima para crescimento dessas bactérias está na faixa de 25°C a 30°C. Seus processos metabólicos ocasionam diminuição do pH, que às vezes chega próximo do pH = 2 [45].

As bactérias do gênero *Acidithiobacillus ferrooxidans* têm sido ativas na dissolução de sulfetos de cobre na extração comercial desse elemento desde 1670. Tal espécie pode utilizar

como fonte de energia, além do íon ferroso, enxofre e seus derivados, a reação de oxidação de ligas ferrosas é muito controversa [5].



As bactérias da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* são organismos unicelulares, quimiossintetizantes, autotróficos, Gram-negativos e com formato em bastão. Algumas têm flagelos, e possuem tamanho de célula de 0,3 a 0,5 µm de diâmetro e 1,0 a 1,7 µm de comprimento [46-47].

A espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* crescem no intervalo de pH 1,0 a 6,0, sendo o pH ótimo para alcançar a máxima velocidade de crescimento de 2,0 a 2,5. De modo análogo, sobrevive em um intervalo de temperatura de 2 a 40°C, mas o intervalo de 28 a 35°C é o mais favorável. Entretanto, o *Acidithiobacillus ferrooxidans* cresce em pH baixo, sendo seu pH citoplasmático interno próximo da neutralidade, e o gradiente de pH através da sua membrana citoplasmática é um dos maiores de todos os organismos [46].

As bactérias do gênero *Acidithiobacillus* são encontradas em diversos ambientes, como locais de mineração, rio com elevada carga de dejetos orgânicos, áreas de tratamento de esgoto e estuários, além de estruturas da construção civil, provocando danos à mesma. A biodeteriorização da qualidade de água, geração de ácido sulfúrico e a precipitação de óxidos de ferro são problemas sérios associados a estes microrganismos.

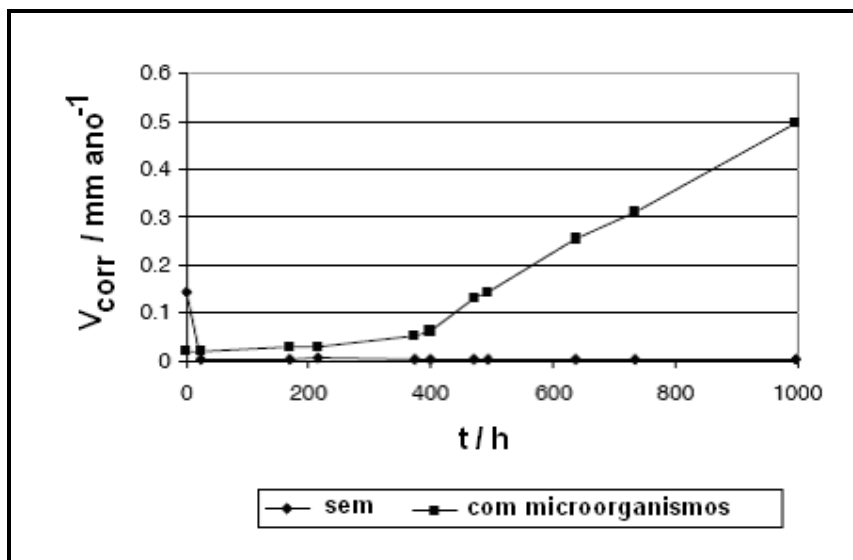
A corrosão microbiológica é um processo que afeta principalmente a indústria do petróleo, particularmente a de extração de hidrocarbonetos, transporte e armazenagem. Este tipo de corrosão tem sido avaliado normalmente por testes microbiológicos, e apenas algumas referências mencionam outros métodos, como as técnicas bioeletroquímicas.

Gayosso et al utilizaram duas técnicas diferentes: resistência de polarização e ruído eletroquímico para estudar a corrosão de um consórcio de microorganismos de um gasoduto que transportava gás no sudeste do México [55].

As técnicas eletroquímicas utilizadas apresentaram uma tendência similar no comportamento da taxa de corrosão, e valores de velocidade de corrosão acima de 0,3 mm ano<sup>-1</sup> foram observados. Um tipo de corrosão localizada foi observado sobre a superfície metálica, e foi associada à bactéria *Desulfovibrio Vietnamensis*. Consideraram que a taxa de



corrosão aumentava durante os experimentos, figura 3.7, e que isto significa que é diretamente proporcional a espécie sésil que induz a corrosão metálica. Devido a esta situação, é muito importante para determinar a cinética do crescimento sésil quando se estuda processo de corrosão microbiológica.



**Figura 3.7** - Velocidade de corrosão utilizando-se a técnica de resistência de polarização para o aço API XL 52, exposto a condições na ausência e presença de microorganismos [55].

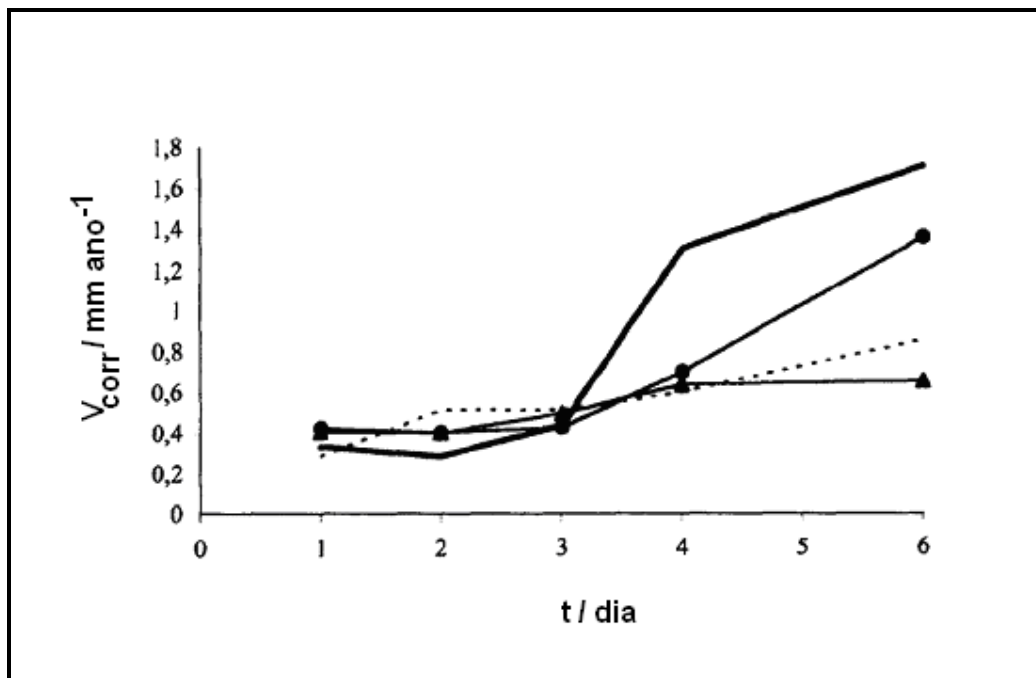
Os resultados da figura 3.7 mostram uma oscilação na velocidade de corrosão na presença dos microorganismos nos primeiros instantes, ora menor e depois maior velocidade de corrosão em relação ao sistema na ausência dos microorganismos,

Os autores salientam que o uso da técnica de ruído eletroquímico pode identificar em qual momento em que o processo tornar-se corrosão localizada [55].

Paul Linhardt em seu trabalho mostrou que a corrosão microbiológica influenciada por microorganismos oxidantes do manganês é um fenômeno que ocorre em água doce, normalmente em sistemas contendo aços inoxidáveis [56].

Zs. Keresztes et al [57] estudaram a influência dos biocidas na corrosão microbiológica do aço doce e ligas de bronze. A ação das bactérias anaeróbicas de redução de sulfato na corrosão do aço e do bronze, foi estudada. O uso de biocidas, em diferentes

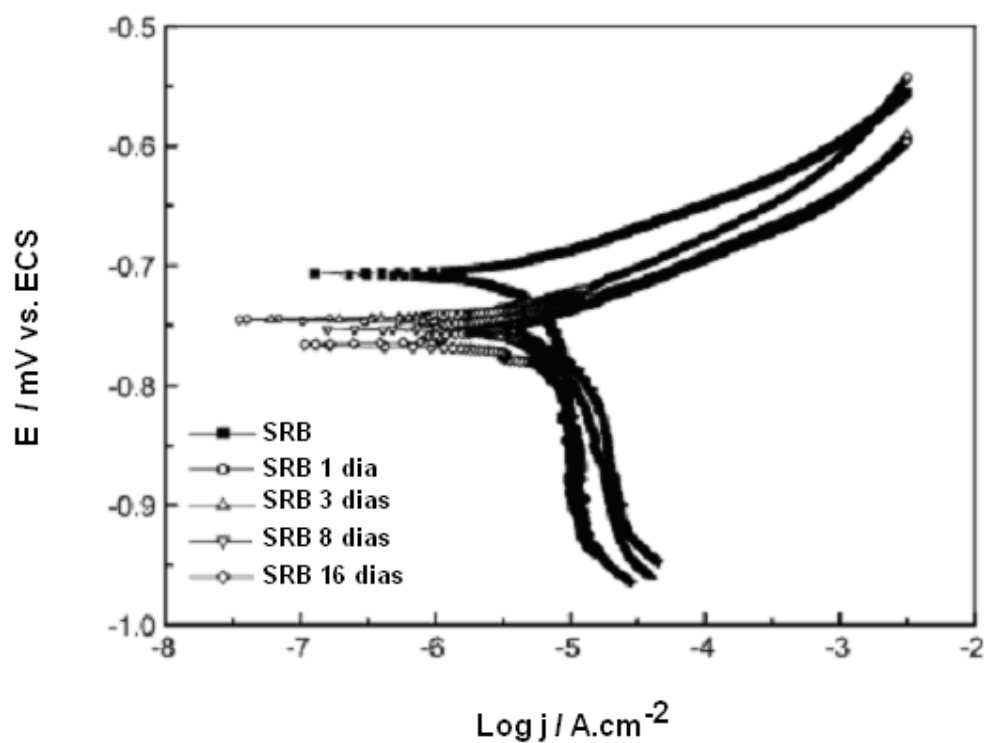
concentrações, fora testado para inibir a eficiência metabólica atividade destas bactérias: N-hidroximetilglicina (GLY) e N-hidroximetilfenilalanina (PHE).



**FIGURA 3.8** – Velocidade de corrosão para op aço doce em meio na ausência (----) e presença de *Desulfovibrio Desulfuricans* sem (—) e com biocidas: (▲) GLY e (●) PHE [57].

De acordo com os resultados, figura 3.8, os biocidas aplicados têm diferente eficiência inibidora sobre a bactéria.

Kuang et al estudaram as influências do processo crescente de bactérias redutoras de sulfato em sistemas de águas salgadas. Os resultados indicam que as médias da taxa de corrosão do aço não dependem do número de microorganismos, mas do acúmulo de produtos de metabolismo destas bactérias redutoras de sulfato [58]. Os autores apresentam na figura 3.9, as bactérias redutoras de sulfato aumentam a taxa de corrosão do aço carbono em comparação com a água do mar sem bactérias.



**FIGURA 3.9** – Curvas de polarização potenciodinâmicas para o aço carbono D 36 em água do mar sem bactérias redutoras de sulfato (SBR) ou na presença de diferentes concentrações de SBR [58].

### 3.4 MICROORGANISMOS

A palavra **Microbiologia** provém do grego, onde:

<p><i>Mikros</i> = pequeno  <i>Bios</i> = vida  <i>Logos</i> = ciência</p>
--

Desta forma, Microbiologia é o estudo dos organismos microscópicos. Ciência esta que se estuda a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação dos seres microscópicos. Incluindo o estudo da sua distribuição natural, suas relações

recíprocas e com outros seres vivos, seus efeitos benéficos e prejudiciais sobre os homens e as alterações físicas e químicas que provocam em seu meio ambiente [48].

Em sua maior parte, a Microbiologia trata com organismos microscópicos unicelulares. Nas chamadas formas superiores de vida, os organismos são compostos de muitas células, que constituem tecidos altamente especializados e órgãos destinados a exercer funções específicas. Nos indivíduos unicelulares, todos os processos vitais são realizados numa única célula. Independentemente da complexidade de um organismo, a célula é, na realidade, a unidade básica da vida [48].

Todas as células vivas são basicamente semelhantes. Conforme já foi visto, elas compõem-se de protoplasma (do grego: a primeira substância formada), um complexo orgânico coloidal constituído principalmente de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos; o conjunto é circundado por membranas limitantes ou parede celular, e todos contêm um núcleo ou uma substância nuclear equivalente [48].

Todos os sistemas biológicos têm as seguintes características comuns: habilidade de reprodução, capacidade de ingestão ou assimilação de substâncias alimentares, (metabolizando-as para suas necessidades de energia e de crescimento), habilidade de excreção de produtos de escória, capacidade de reagir a alterações do meio ambiente (algumas vezes chamada de "irritabilidade"), e suscetibilidade à mutação [48].

Os princípios da Biologia podem ser demonstrados através do estudo da Microbiologia, pois os microrganismos têm muitas características que os tornam instrumentos ideais para a pesquisa dos fenômenos biológicos. Os microrganismos fornecem sistemas específicos para a investigação das reações fisiológicas, genéticas e bioquímicas, que são a base da vida. Eles podem crescer, de maneira conveniente, em tubos de ensaio ou frascos, exigindo, assim, menos espaço e cuidados de manutenção do que as plantas superiores e os animais. Além disso, crescem rapidamente e se reproduzem num ritmo muito alto; algumas espécies bacterianas demonstram quase 100 gerações num período de 24 horas. Os processos metabólicos dos microrganismos seguem os padrões que ocorrem nos vegetais superiores e nos animais. As leveduras, por exemplo, utilizam a glicose, basicamente do mesmo modo que as células dos tecidos de mamíferos, revelando que o mesmo sistema enzimático está presente nestes organismos tão diversos [48].

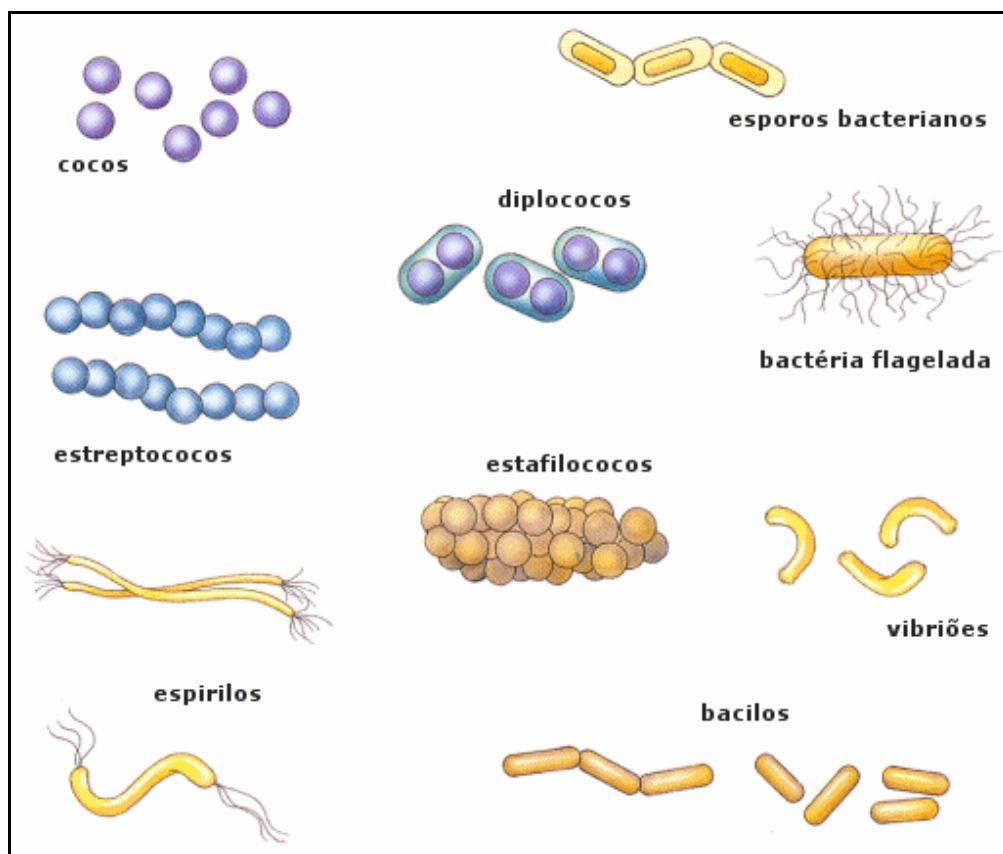
Em Microbiologia pode-se estudar os organismos em grande detalhe e observar seus processos vitais durante o crescimento, a reprodução, o envelhecimento e a morte.

Modificando-se a composição do meio ambiente, é possível alterar as atividades metabólicas, regular o crescimento e, até alterar alguns detalhes do padrão genético, tudo sem causar a destruição do microrganismo [48].

Os principais grupos de microrganismos são os protozoários, fungos, algas e bactérias. Os vírus, apesar de não serem considerados vivos, têm algumas características de células vivas e por isso são estudados como microrganismos [48].

A palavra bactéria vem do termo *bacterium*, derivada da palavra grega que significa "pequeno bastão".

A forma das bactérias é diversificada, vide figura 3.10, as esféricas são chamadas **cocos**; quando alongadas, recebem o nome de **bacilos**; e, em formas helicoidais, em geral móveis, são denominadas **espirilos**. Muito freqüentemente, as células bacterianas aparecem em grupos, e não isoladas. Os **cocos** em pares formam os **diplococos**; dispostos em fileiras, são chamados **estreptococos**; e, quando aparecem como cachos de uvas, denominam-se **estafilococos**.

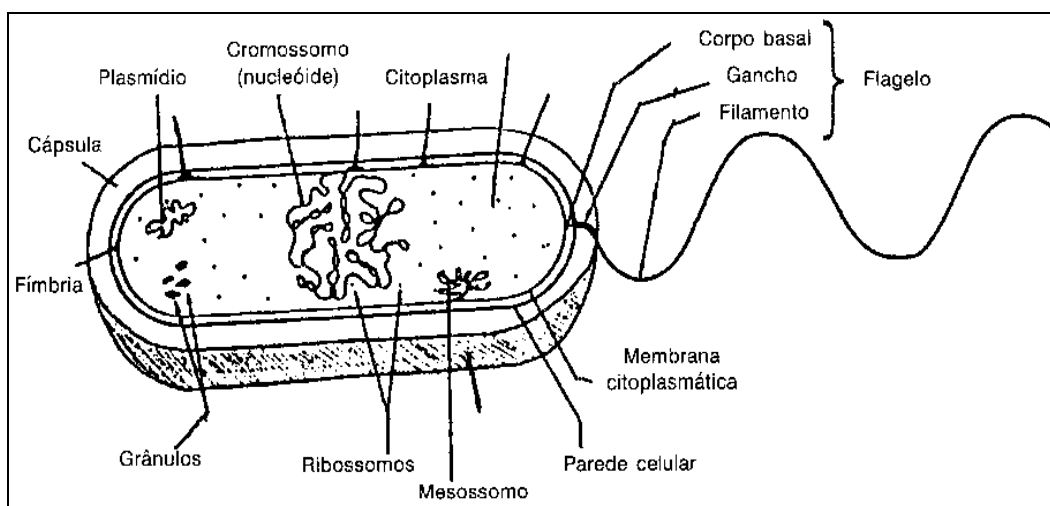


**Figura 3.10** - Principais formas das bactérias [49].

### 3.5 Estruturas das bactérias

O estudo da estrutura das bactérias, figura 3.11 mostra que elas apresentam, envolvendo o seu citoplasma, uma membrana plasmática em torno da qual se encontra uma espessa e rígida camada, a parede bacteriana. Por fora da parede, pode ocorrer uma terceira camada, viscosa, que, em algumas espécies, é espessa, constituindo a cápsula. No interior da célula procarionte, além do citoplasma, encontra-se uma região correspondente ao núcleo, chamada nucleóide, além de grânulos diversos. Frequentemente partem da superfície bacteriana prolongamentos filamentosos de dois tipos: os flagelos, responsáveis pela movimentação das bactérias, e as fímbrias, estruturas que participam da transferência unidirecional de DNA entre células bacterianas.

A Figura 3.11 apresenta esquematicamente uma célula bacteriana típica com as principais estruturas externas e internas à membrana plasmática.



**Figura 3.11** -Estrutura típica das bactérias [50].

A membrana plasmática das bactérias tem a mesma estrutura trilaminar da membrana plasmática das células eucariontes. Nela se situam moléculas receptoras, as proteínas relacionadas com o transporte transmembrana e as moléculas da cadeia respiratória análoga à cadeia respiratória existente na membrana interna das mitocôndrias das células eucariontes.

Às vezes, observam-se invaginações da membrana, formando um complexo ao qual se deu o nome de mesossomo (meso, meio, e soma, corpo). Essas estruturas aumentam a quantidade de membrana plasmática, aumentando também o número de moléculas que

participam dos processos funcionais importantes, como a respiração. Os mesossomos também participam da formação dos septos e da parede, que aparecem quando a bactéria se divide.

Cada bactéria contém um ou mais nucleóides, regiões arredondadas ou alongadas bem visíveis nas micrografias eletrônicas. O nucleóide contém o cromossomo da bactéria e muitas vezes se localiza nas proximidades ou mesmo ligado à membrana plasmática. O DNA do cromossomo bacteriano é um filamento circular, constituído por duas cadeias dispostas em hélice, mede cerca de 1 mm de comprimento e sua molécula se dobra muito para caber na célula bacteriana. O cromossomo bacteriano é diferente dos cromossomos das células eucariontes, que são estruturas muito mais elaboradas e constituídas de DNA e maior variedade de proteínas. Numa mesma espécie bacteriana, o número de cromossomos, por célula, é variável, porém geralmente existe mais de um. Como as bactérias não se dividem por mitose, seus cromossomos não apresentam a condensação cíclica observada nos cromossomos das células eucariontes durante a divisão celular. Não existe ciclo celular nas bactérias.

Além dos cromossomos do nucleóide, as bactérias podem apresentar outros, também circulares, muito menores. Esses pequenos cromossomos, localizados fora do nucleóide, também veiculam informação genética e são denominados plasmídios. Os plasmídios se multiplicam independentemente dos cromossomos principais. Esses elementos possuem genes para a própria replicação e genes que influenciam favoravelmente a bactéria. Todavia, não são essenciais para a vida da bactéria. Os plasmídios geralmente ocorrem em cópias múltiplas, o que aumenta muito a eficiência dos genes neles contidos. Um plasmídio capaz de se integrar no cromossomo da bactéria recebe o nome de episossomo.

Os plasmídios apresentam características que os tornam muito úteis aos estudos de biologia molecular, sendo muito utilizados nas técnicas de DNA recombinante ( engenharia genética) para transferir genes entre organismos diferentes.

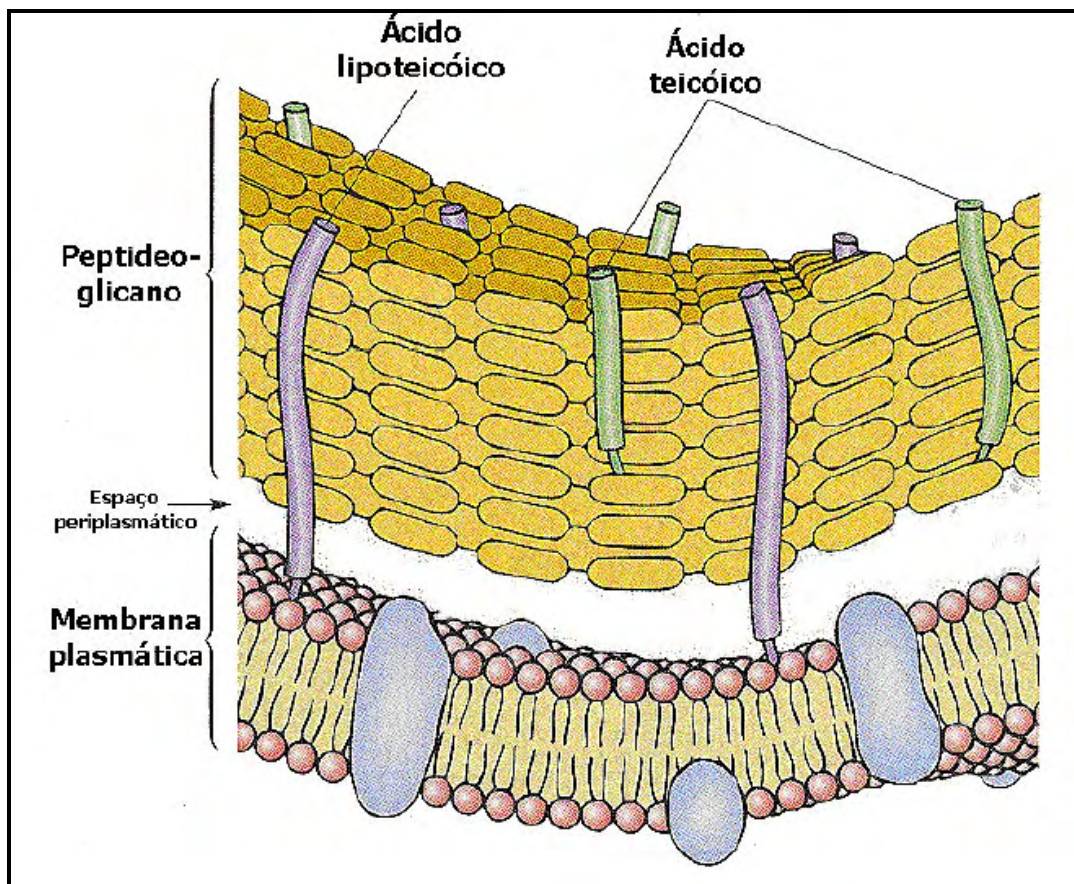
Também nas células procariontes, como nas eucariontes, pode haver transferência de genes para locais diferentes no DNA da mesma célula, pelos transposons, que são segmentos de DNA dotados da capacidade de se transferirem entre plasmídios e cromossomos, “saltando” de um local para outro. Os transposons aumentam as variações genéticas entre as bactérias, facilitando muito a transferência de resistência a antibióticos e a outras substâncias tóxicas para elas. Essa propriedade aumenta em muito a sobrevivência das bactérias, quando elas enfrentam condições adversas. Tanto as bactérias como nos demais seres vivos, os transposons são elementos importantes no processo evolutivo.

Todas as bactérias, exceto os microplasma, apresentam uma parede rígida, responsável pela forma da célula e que a protege contra a ruptura e contra a penetração de bacteriófagos (bacteriógrafo é o nome dados aos vírus que atacam as bactérias). Pelo transporte ativo de moléculas e íons, a maioria das bactérias mantém pressão osmótica interna de 5 a 20 atmosferas, muito mais elevadas do que a pressão osmótica de certos ambientes onde elas vivem na natureza. A parede que essas bactérias se rompem, possibilitando sua sobrevivência e multiplicação e meio hipotônico (ambiente com pressão osmótica inferior à do citoplasma bacteriano). Apesar de ser rígida e resistente, a parede é permeável, o que é essencial para a nutrição da célula e a eliminação de moléculas diversas produzidas pelas bactérias. A parede contém moléculas antigênicas (capazes de provocar uma resposta imunitária e de reagir com os respectivos anticorpos) que podem ser utilizadas para a identificação das bactérias.

Devido às propriedades de suas paredes, as bactérias são divididas em dois grandes grupos: as **Gram-positivas** e as **Gram-negativas**. A colocação de um determinado tipo de bactéria num desses grupos depende de seu comportamento diante da colocação de Gram. As bactérias que, após aplicação da técnica de Gram, aparecem coradas em roxo são chamadas Gram-positivas. As que não retêm a cor roxa são as Gram-negativas. Para facilitar sua visualização ao microscópio, as últimas são geralmente coradas em vermelho com safranina ou fucsina, que não altera a cor roxa das Gram-positivas.

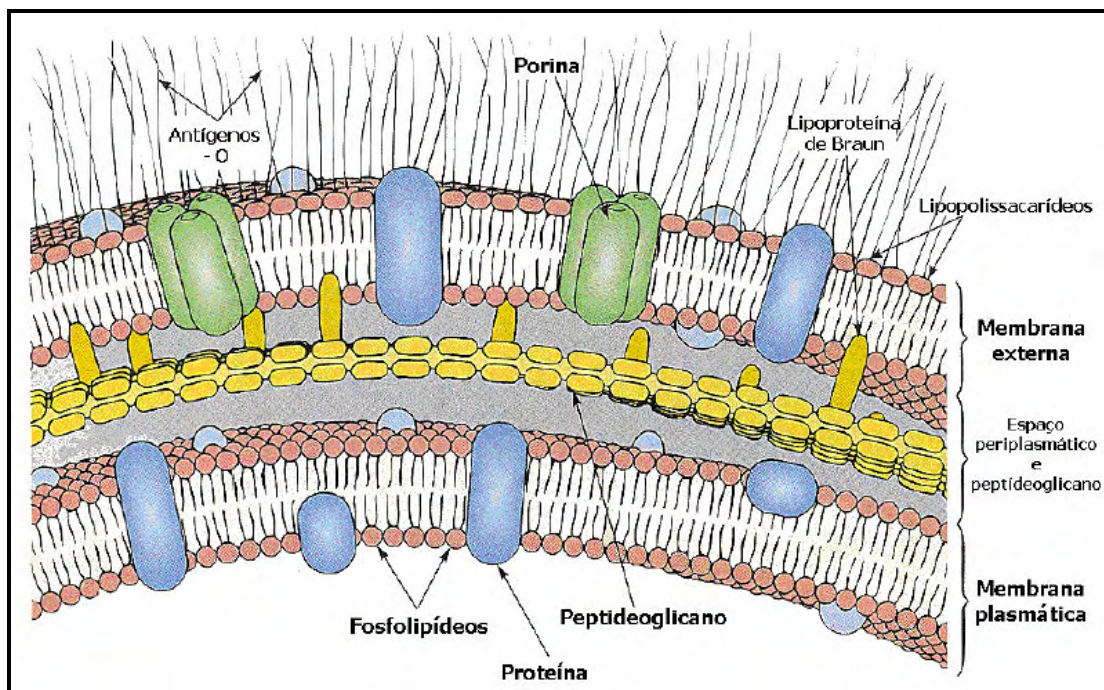
A **parede das células Gram-positivas**, figura 3.12 é simples, sendo formada apenas por uma espessa camada de peptidoglicanas (sinônimos: mureína, mucopeptídeo) situada entre a membrana plasmática e a cápsula, que fica mais externamente. As peptidoglicanas são compostos típicos das paredes bacterianas, constituídos por cadeias de aminoácidos ligadas a uma cadeia de hidratos de carbono. São responsáveis pela rigidez e pela resistência da parede das bactérias. A parede das células Gram-positivas geralmente possui moléculas de ácidos teicóicos. Esses ácidos são polímeros constituídos de vários tipos de moléculas como glicerol, hidratos de carbono e aminoácidos.





**Figura 3.12** : Parede celular de bactérias Gram-positivas [50].

A **parede celular das bactérias Gram-negativas** é muito complexa, figura 3.13, sendo formada pelas seguintes camadas, de dentro para fora: 1) uma camada de peptidoglicanas, mais delgada do que das bactérias Gram-positivas; 2) uma camada de lipoproteínas; 3) a membrana externa, de estrutura trilaminar, como as das demais membranas celulares; 4) a camada de lipopolissacarídeos (LPS).



**Figura 3.13:** Parede celular de bactérias Gram-positivas [50].

A membrana externa é uma estrutura peculiar. Embora localizada na parte externa da parede, tem estrutura semelhante às membranas celulares em geral. A membrana externa tem a arquitetura de um mosaico fluido, mas os fosfolípidios de seu folheto externo são substituídos por abundantes moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), que chegam a constituir uma verdadeira camada, formando uma forte barreira em volta da célula. Entre outras funções, os lipopolissacarídeos têm um papel protetor, como, por exemplo, nas bactérias entéricas que resistem às enzimas hidrolíticas e aos sais biliares do trato digestivo. A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém moléculas protéicas, denominadas porinas, que formam canais por onde penetram diversas substâncias, como aminoácidos e hidratos de carbono. Como a camada de lipopolissacarídeos é impermeável, praticamente todas as moléculas que penetram na parede, para atingirem a membrana plasmática, o fazem pelos canais de porinas.

A cápsula, presente em muitas bactérias, figura 3.11, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, é uma camada de espessura e constituição molecular variadas e de consistência mucosa. Costuma conter antígenos potentes, conferindo à bactéria propriedades imunológicas bem definidas. Apesar da presença da cápsula não estar sempre relacionada à capacidade da bactéria em agredir o hospedeiro, essa estrutura confere às bactérias

patogênicas (pathos, doença, e genos, gerar) certa resistência a fagocitose e ao ataque de outros elementos de defesa dos organismos, explicando assim, em parte, sua atividade patogênica.

A hidrólise da parede bacteriana ou o bloqueio de sua síntese podem gerar os **protoplastos** ou os **esferoplastos**. A remoção da parede deve ser feita em meio de cultivo de pressão osmótica adequada, para prevenir a ruptura das células sem parede. Geralmente, os protoplastos são derivados das bactérias Gram-positivas, e os esferoplastos, das Gram-negativas. Ambos são esféricos. A principal diferença entre os dois é que os protoplastos são totalmente desprovidos de constituintes da parede e, por isso, osmoticamente muito mais frágeis do que os esferoplastos, que retêm alguns materiais da membrana externa da parede bacteriana.

As células sem parede e que são capazes de proliferar nos cultivos ou nos organismos hospedeiros recebem o nome de formas L. Algumas dessas formas L podem voltar a sintetizar paredes, revertendo à sua forma normal. Outras perdem definitivamente a capacidade de voltar a fabricar novas paredes.

Certas bactérias produzem formas L espontaneamente, muitas vezes causando doenças crônicas e de tratamento difícil, porque as formas L são mais resistentes a muitos antibióticos.

Sendo desprovido de organelas membranosas, o citoplasma das células bacterianas é formada essencialmente pelo **citossol**, contendo moderada quantidade de ribossomos, que se prendem a moléculas de RNA mensageiro (mRNA) para formar **polirribossomos**. Nas bactérias fotossintéticas, o pigmento captador da luz solar se localiza em **lamelas paralelas** situadas próximo à membrana plasmática e que, à vezes, se dobram e formam corpúsculos isolados.

As bactérias podem acumular material de reserva em grânulos osmoticamente inertes, não envolvidos por membrana. Na falta de nitrogênio, quando não podem sintetizar proteínas nem ácidos nucléicos, as bactérias acumulam o carbono excedente sob a forma de polímeros do ácido hidroxibutírico ou de polímeros de glicose, como o amido e o glicogênio. Esses grânulos são usados como fonte de carbono para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos, quando as células obtêm nitrogênio suficiente. São muito freqüentes os grânulos de metafosfato polimerizado, que foram denominados **grânulos de volutina**, antes de sua caracterização química.

As células procariontes não apresentam citoesqueleto, ao contrário das células eucariontes, que exibem um citoesqueleto responsável pela constituição e manutenção da forma das células e que participa dos movimentos celulares. A forma das células das bactérias é determinada pela parede, que é uma estrutura rígida.

Certas bactérias fotossintéticas (usam a luz do Sol como fonte de energia) que vivem em meio aquático possuem vesículas cilíndricas contendo gás que controlam a flutuação do microrganismo. Essas vesículas alongadas são limitadas por membranas protéicas e, portanto, diferentes das membranas em geral, onde predominam lipídios. Por meio do controle de sua flutuação essas bactérias procuram, no meio líquido, a profundidade mais conveniente no que se refere à concentração de nutrientes, concentração de oxigênio e intensidade luminosa.

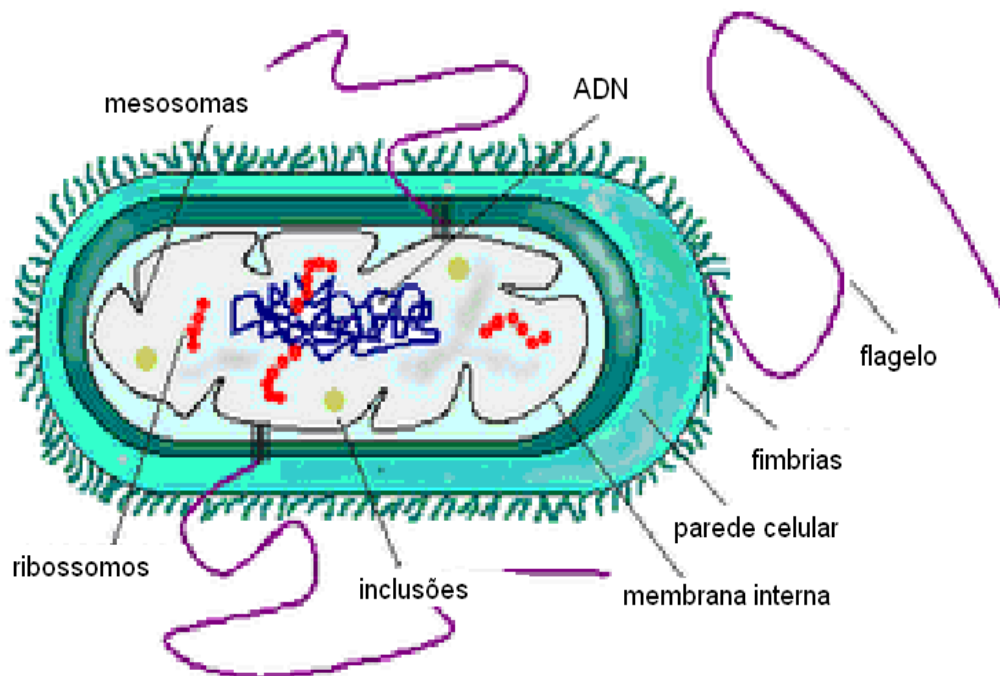
Os **prolongamentos** observados na superfície das bactérias são de dois tipos – os flagelos e as fímbrias, figura 3.11. Os flagelos são órgãos de locomoção filamentosos, medindo geralmente de 3 a 12 microm de comprimento e 12 a 30 nm de diâmetro. Porém, em certas bactérias, o flagelo pode atingir algumas centenas de micrômetros de comprimento. Na base do flagelo existe uma dilatação, principal responsável pela rotação do flagelo, que se encontra imersa na parede e na membrana plasmática da célula bacteriana. O flagelo é um polímero da proteína **flagelina**, característica de cada espécie de bactéria. Os **monômeros** de flagelina se organizam em 11 protofilamentos para constituir o flagelo.

Não há indícios de que o ATP participe do movimento flagelar. Os dados disponíveis sugerem que a energia é fornecida por um fluxo de prótons. Os flagelos são rotores semi-rígidos aos quais a célula imprime um movimento de rotação. O flagelo pode girar num sentido algum tempo e, em seguida, girar no sentido contrário, alterando a direção do movimento bacteriano.

As **fímbrias**, figura 3.11, são filamentos rígidos, de natureza protéica, mais numerosos do que os flagelos e não associados à locomoção. As fímbrias são mais finas e mais curtas do que os flagelos. Como estes, as fímbrias também são compostos de subunidades protéicas. Há duas classes de fímbrias: as **fímbrias comuns**, que podem promover a aderência das bactérias às células eucariontes agredidas, tendo assim relevante papel na patogenicidade (capacidade de produzir doença) bacteriana, e as **fímbrias sexuais**, mais longas, que são responsáveis pela fixação das bactérias durante o processo de conjugação. Nesse processo, há passagem unidirecional de DNA da célula bacteriana doadora para a célula receptora, através de comunicações que se formam entre os citoplasmas das duas células (não por dentro das

fimbrias). As fimbrias sexuais estão presentes apenas nas bactérias doadoras, enquanto as células receptoras possuem, na sua superfície, macromoléculas que facilitam a fixação das fimbrias. O papel das fimbrias sexuais é apenas fixar temporariamente a célula doadora e a receptora.

A figura 3.14 resume a estruturação dos principais componentes da célula bacteriana.



**Figura 3.14** - Estruturação dos principais componentes da célula bacteriana [50].

O cultivo dos microrganismos, em condições laboratoriais, é um pré-requisito para seu estudo adequado. Para que isto possa ser realizado, é necessário o conhecimento de suas exigências nutritivas e das condições físicas requeridas.

### 3.5.1. Tipos Nutritivos das Bactérias

As bactérias podem ser divididas em grupos com base em suas exigências nutritivas. A principal separação corresponde aos grupos:

**Fototróficos:** Organismos que utilizam a energia radiante como fonte de energia. Existem bactérias que utilizam o CO<sub>2</sub> como principal fonte de carbono; são as fotolitotróficas. Outras exigem um composto orgânico (álcoois, ácidos graxos, aminoácidos) e são ditas fotorganotróficas.

**Quimiotróficos** Organismos incapazes de utilizar a energia radiante; dependem da oxidação de compostos químicos para a obtenção de energia. Bactérias que utilizam o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e oxidam compostos inorgânicos (como por exemplo os nitritos), ou elementos químicos (como por exemplo o enxofre) para obtenção da fonte de energia são chamadas quimiolitotróficas. As que utilizam compostos orgânicos para obter energia, são chamadas quimiorganotróficas.

**Tabela 3.1** - Principais tipos nutritivos das bactérias [50]. (\*) aa = aminoácidos.

<b>Bactérias</b>	<b>Sais Inorgânicos</b>	<b>Carbono Orgânico</b>	<b>Nitrogênio Inorgânico</b>	<b>1 aa</b>	<b>2 ou + aa</b>	<b>Uma Vitamina</b>	<b>Duas ou + vitaminas</b>
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X				
<i>Salmonella typhi</i>	X	X	X	X			
<i>Proteus vulgaris</i>	X	X	X	X		X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	X	X		X	X	
<i>Lactobacillus</i>	X	X	X		X		X
<i>Acidophilus</i>							

As bactérias fotolitotróficas e quimiolitotróficas são conhecidas, comumente, como **autotróficas**, ao passo que as espécies fotorganotróficas e quimiorganotróficas são designadas **heterotróficas**. Os principais nutrientes e exigências para estes tipos de bactérias são apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2 [50].

**Tabela 3.2** - Exigências nutritivas mínimas de algumas bactérias heterotróficas [50].

<b>Tipo</b>	<b>Fonte de Energia Para Crescimento</b>	<b>Fonte de Carbono Para Crescimento</b>	<b>Exemplo de Gênero</b>
<u>Fototróficos:</u> <i>Fotolitotrófico</i> (autotrófico)	Luz	CO <sub>2</sub>	<i>Chromatium</i>
<i>Fotorganotrófico</i> (heterotrófico)	Luz	Composto orgânico	<i>Rhodopseudomonas</i>
<u>Químico:</u> <i>Químio-litotrófico</i> (autotrófico)	Oxidação de composto inorgânico	CO <sub>2</sub>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Químio-organotrófico</i> (heterotrófico)	Oxidação de composto orgânico	Composto orgânico	<i>Escherichia</i>

### 3.5.2 Meios Bacteriológicos

Para o cultivo rotineiro de microrganismos heterotróficos, utilizam-se certas matérias-primas complexas, tais como as peptonas, os extratos de carne e de levedura, tabela 3.3, daí resultando um meio que promove o desenvolvimento de grande variedade de bactérias e de outros microrganismos. Quando se deseja um meio sólido, adiciona-se o agar-agar como agente solidificante. O caldo e o agar-agar nutritivos são exemplos de meios líquidos e sólidos, relativamente simples, indicados para a cultura de microrganismos heterotróficos comuns [50].

Alguns microrganismos não se desenvolvem bem nestes meios, pois demonstram exigências de nutrientes específicos, como vitaminas e outras substâncias estimulantes. Tais microrganismos são chamados de heterotróficos fastidiosos, e necessitam de meios especiais para seu cultivo, isolamento e reconhecimento [50].

Os meios de cultura, de acordo com a sua aplicação ou função, podem ser classificados, entre outros, como:

- Meios Enriquecidos: a adição de sangue, soro ou extratos de tecidos animais ou vegetais ao caldo ou agar-agar nutritivos proporciona nutrientes acessórios, de modo que o meio possa permitir o crescimento de heterotróficos [50];
- Meios Seletivos: a adição de certas substâncias químicas específicas ao agar-agar, nutritivo previne o crescimento de um grupo de bactérias sem agir sobre outras. O cristal violeta, por exemplo, em uma dada concentração, impede o crescimento de bactérias gram-positivas, sem afetar o desenvolvimento das bactérias gram-negativas [50];
- Meios Diferenciais: a incorporação de certos reagentes ou substâncias químicas no meio pode resultar num tipo de crescimento ou modificação, após a inoculação e a incubação, que permite ao observador distinguir os tipos de bactérias. Por exemplo, inoculando-se uma mistura de bactérias num meio de agar-agar sangue, algumas das bactérias podem hemolisar (destruir) as células vermelhas e outras não. A zona clara ao redor da colônia é a evidência de ter ocorrido à hemólise. Assim, pode-se estabelecer a distinção entre bactérias hemolíticas e não-hemolíticas, de acordo com o seu desenvolvimento [50].



**Tabela 3.3** - Características de vários produtos complexos, usados como ingredientes dos meios de cultura [50].

<b>MATÉRIA PRIMA</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>VALOR NUTRITIVO</b>
Extrato de carne	Extrato aquoso de tecido muscular, concentrado sob a forma de pasta.	Contém as substâncias solúveis dos tecidos animais, incluindo carboidratos, compostos orgânicos de nitrogênio, vitaminas hidrossolúveis e sais.
Peptona	Produto que resulta da digestão de materiais protéicos como carne, caseína e gelatina; a digestão protéica é realizada por meio dos ácidos ou de enzimas; existem muitas peptonas diferentes (dependendo da proteína usada e do método de digestão) para uso de meios bacteriológicos; as peptonas diferem em suas propriedades de promover o crescimento.	Principal fonte de nitrogênio orgânico; pode conter algumas vitaminas e, às vezes, carboidratos, dependendo do tipo de material protéico digerido.
Agar-agar	Carboidratos complexos, obtidos de certas algas marinhas; tratado para a remoção de substâncias estranhas.	Usado como agente solidificante dos meios; o agar-agar, dissolvido em soluções aquosas, gelifica quando a temperatura é reduzida a menos de 45° C; não é considerado como fonte nutritiva para as bactérias.
Extrato de levedo	Extrato aquoso de leveduras comercialmente apresentado sob a forma de pó	Fonte muito rica de vitamina B, também contém compostos orgânicos de nitrogênio e de carbono

### 3.5.3. Condições Físicas Necessárias ao Crescimento

Assim como as bactérias variam com relação às exigências nutritivas, também demonstram respostas diversas às condições físicas do ambiente.

Temperatura: o crescimento bacteriano pode ter seu ritmo e quantidade, determinados pela temperatura, uma vez que esta influencia as reações químicas do processo de crescimento. Cada espécie de bactéria cresce sob temperaturas situadas em faixas características e, sendo assim, são classificadas nos seguintes grupos [50]:

1. Bactérias *psicrófilas*: são capazes de crescer a 0° C ou menos, embora seu ótimo seja entre 15° C ou 20° C.

2. Bactérias *mesófilas*: crescem melhores numa faixa de 25 a 40° C.

3. Bactérias *termófilas*: crescem melhores a temperaturas de 45 a 60° C.

A temperatura ótima de crescimento é a temperatura de incubação que possibilita o mais rápido crescimento, durante curto período de tempo (12 a 24 horas).

Exigências atmosféricas: os principais gases que afetam o crescimento bacteriano são o oxigênio e o dióxido de carbono. Como as bactérias apresentam grande variedade de resposta ao oxigênio livre, elas são divididas em:

1. Bactérias *aeróbias*: crescem na presença de oxigênio livre.

2. Bactérias *anaeróbias*: crescem na ausência de oxigênio livre.

3. Bactérias *anaeróbias facultativas*: crescem tanto na presença como na ausência do oxigênio livre.

4. Bactérias *microaerófilas*: crescem na presença de quantidades pequenas de oxigênio livre.

Acidez e alcalinidade (pH): para a maioria das bactérias, o pH ótimo de crescimento localiza-se entre 6,5 e 7,5. Embora poucos microrganismos possam desenvolver-se nos limites extremos de pH, as variações mínimas e máximas, para a maior parte das espécies, estão entre pH 4 e pH 9 [50].

### 3.5.4. Principais Grupos de Bactérias

A referência padrão para a classificação e taxonomia bacterianas é o *Bergey's manual of determinative bacteriology* [53]. Este manual divide as bactérias em 19 grupos, vide tabela 3.4.

**Tabela 3.4** – Grupos de bactérias [53].

<b>Grupo 1</b>	<b>Bactérias fototróficas</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Bactérias deslizantes</b>
<b>Grupo 3</b>	<b>Bactérias com bainha</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Bactérias gemulantes e/ou pedunculadas</b>
<b>Grupo 5</b>	<b>Espiroquetas</b>	<b>Grupo 6</b>	<b>Bactérias espiraladas e encurvadas</b>
<b>Grupo 7</b>	<b>Coco e bacilos gram-negativos aeróbicos</b>	<b>Grupo 8</b>	<b>Bacilos gram-negativos facultativos</b>
<b>Grupo 9</b>	<b>Bactérias gram-negativas anaeróbicas</b>	<b>Grupo 10</b>	<b>Cocos e cocobacilos gram-negativos</b>
<b>Grupo 11</b>	<b>Cocos gram-negativos anaeróbicos</b>	<b>Grupo 12</b>	<b>Bactérias gram-negativas quimiolitotróficas</b>
<b>Grupo 13</b>	<b>Bactérias produtoras de metano</b>	<b>Grupo 14</b>	<b>Cocos gram-positivos</b>
<b>Grupo 15</b>	<b>Bacilos e cocos esporulados</b>	<b>Grupo 16</b>	<b>Bacilos gram-positivos não-esporulados</b>
<b>Grupo 17</b>	<b>Actinomicetos e microrganismos afins</b>	<b>Grupo 18</b>	<b>Rickettsias</b>
<b>Grupo 19</b>	<b>Micoplasmas</b>		

Recentemente, Lynn Margulis e Karlene Schwartz [45] propuseram um sistema de classificação útil que divide as bactérias em 16 filos de acordo com algumas de suas características mais significantes. A **tabela 3.5** mostra algumas características de 11 destes grupos.

**Tabela 3.5 - Características de alguns grupos de bactérias [45].**

<b>NOME DO GRUPO</b>	<b>FORMA (a)</b>	<b>MOTILIDADE (b)</b>	<b>METABOLISMO (c)</b>	<b>PAPEL ECOLÓGICO</b>
<b>METANOGENICAS</b>	B, E, C	N, F	Q, F	Algumas digerem celulose; outras utilizam metano; outras reduzem enxofre.
<b>OMNIBACTÉRIAS</b>	B	N, F	H	Saprófitas, patógenas, decompositoras.
<b>CIANOACTÉRIAS</b>	B, C, M	D, N	F	Fixadoras de carbono e nitrogênio.
<b>CLOROACTÉRIAS</b>	C	N	F	Simbiose com tunicados.
<b>MICOPLASMAS, ESPIROPLASMAS</b>	sem parede (d)	N	H	Patógenos de plantas e animais.
<b>ESPIROQUETAS</b>	E	F (e)	H	Decompositores e patógenos.
<b>PSEUDOMONADÁCEAS</b>	B	F	H, Q	Decompositores e patógenos de plantas.
<b>ACTINOMICETOS</b>	M, B	N	H	Solo, plantas, decompositores e fixadores de nitrogênio.
<b>MIXOACTÉRIAS</b>	B	D	H	Solo, animais.
<b>AERÓBIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO</b>	B	N, F	H	Vida livre e em módulos ou raízes de plantas.
<b>QUIMIOAUTOTRÓFICAS</b>	B, C	N, F	Q	Estágios no ciclo do nitrogênio; oxidam compostos do enxofre; oxidam metano ou metanol.

- (a) B = bacilo, C = coco, E = espirilo, M = filamentos ou agregados;  
 (b) F = flagelada, N = não-móvel, D = deslizante;  
 (c) H = heterotróficas, Q = quimiossintéticas, F = fotossintéticas;  
 (d) Mais ou menos esféricas ou alongadas e retorcidas;  
 (e) Flagelo inserido embaixo da membrana lipoprotéica mais externa da parede celular.

### 3.5.5. Bactérias Patogênicas

Muitas doenças de plantas estão associadas com bactérias; quase todos tipos de plantas são suscetíveis a um ou mais tipos de doenças bacterianas. Os sintomas destas doenças variam, mas elas geralmente se manifestam como manchas de vários tamanhos nos caules,

folhas, flores ou frutos; murchidão, definhamento e raízes moles; necrose, ferrugem e cancos também são sintomas observados. Os gêneros descritos a seguir compreendem as **bactérias fitopatogênicas**:

*Pseudomonas* - causa manchas e estrias nas folhas, definhamento e doenças similares.

*Xanthomonas* - as espécies deste gênero são principalmente fitopatogênicas, responsáveis por processos de necrose. Produzem colônias amarelas, ao lado de outras espécies esbranquiçadas ou de coloração creme.

*Agrobacterium* ssp. - suas espécies vivem no solo ou nas raízes ou caules de plantas, onde desenvolvem galhas.

*Corynebacterium* - é um gênero que compreende espécies parasitas do homem e dos vegetais. As espécies fitopatogênicas são encontradas no solo e nos vegetais doentes, sendo responsáveis por doenças vasculares da alfafa, pela podridão das batatas, dos pastos, dos tomates e doenças de muitas outras plantas.

*Erwinia* - as espécies deste gênero invadem os tecidos das plantas vivas e provocam necroses, galhas, definhamentos e apodrecimentos.

*Streptomyces* - encontram-se espécies responsáveis pela escara da batata e por uma doença das raízes e radículas da batata-doce.

*Xylella fastidiosa* – responsável pela clorose variegada dos cítricos (ou “Amarelinho”, como a doença é conhecida popularmente no Brasil), que afeta os tecidos vasculares de plantas cítricas, especialmente as laranjeiras, danificando folhas e frutos.

Bactérias também causam muitas doenças humanas, incluindo cólera, lepra, tétano, pneumonia bacteriana, coqueluche e difteria.

Vários gêneros de bactérias patogênicas são de importância particular para o homem. Espécies do gênero *Streptococcus* estão associadas com a escarlatina, febre reumática e outras infecções. A bactéria da escarlatina produz seus sintomas e toxinas fatais somente se ela estiver infectada com o bacteriófago apropriado. O gênero *Staphylococcus* é um dos principais responsáveis pela infecções hospitalares.

A síndrome do choque tóxico é causada por algumas linhagens de *Staphylococcus aureus*. Esta doença caracteriza-se por febre, erupções cutâneas, que aparecem primeiro nas palmas das mãos e nas solas dos pés e depois espalham-se para outras partes do corpo, e queda brusca de pressão. Aproximadamente 85% dos casos de síndrome do choque tóxico registrados nos Estados Unidos ocorreram em mulheres menstruadas, que estavam usando

absorventes internos na época em que apareceram os sintomas. No entanto, homens e mulheres podem contrair esta doença.

Muitas doenças bacterianas são dispersas pelo alimento ou água, como por exemplo a disenteria bacilar, e as febres tifóide e paratifóide. A disenteria bacilar é causada por algumas espécies do gênero *Shigella*. As febres tifóide e paratifóide são doenças intestinais infecciosas agudas causadas pelas bactérias *Salmonella typhi* e *Salmonella enteridis*, respectivamente.

A bactéria *Brucella abortus* causa a doença chamada brucelose, também conhecida como febre ondulante, no homem, e aborto contagioso, no gado. O contágio se dá através da ingestão de leite oriundo de gado contaminado. Como as bactérias são destruídas pelo processo de pasteurização do leite, esta doença está se tornando rara.

O cólera é uma gastroenterite causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, que é transmitida pelo contato com águas ou alimentos contaminados pelas excreções de pacientes ou de portadores convalescentes. Os sintomas compreendem vômitos e fezes IFSC / LCE / diarréicas profusas (aspecto de água de arroz), os quais dão lugar a uma severa desidratação, com perdas de eletrólitos e acidose, muitas vezes fatal.

A legionelose (ou doença dos Legionários) é uma das doenças bacterianas mais recentemente detectadas, afetando um grande número de pessoas nos Estados Unidos. É causada pela bactéria *Legionella pneumophyla* e desenvolve-se como uma forma severa de pneumonia.

A bactéria *Clostridium botulinum* é a causadora do botulismo, uma intoxicação alimentar grave, e às vezes fatal. A doença é contraída pela ingestão de alimentos contendo a toxina botulínica (principalmente enlatados, em conserva ou defumados).

A cárie dentária é provocada por bactérias, principalmente pela espécie *Streptococcus mutans*. As lesões cariosas se desenvolvem sob densas massas de bactérias, conhecidas como placas dentais, aderentes à superfície do dente.

Algumas doenças bacterianas são sexualmente transmitidas e são chamadas de doenças venéreas. Entre as mais comuns estão a gonorréia, causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, e a sífilis, causada pela *Treponema pallidum*, uma espiroqueta.

Ambas doenças são facilmente controladas com penicilina. A gonorréia é muito mais comum e menos séria que a sífilis, que pode ser fatal.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos experimentos foram feitos em triplicatas.

### 4.1 Soluções Empregadas

Todos os reagentes Utilizados para as soluções aqui descritas foram de grau analítico. A água utilizada foi bidestilada.

Eletrólito:

1.  $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ;
2. 10% v/v de meio de cultura (E.C.) + 90% de água bidestilada, acertado a concentração do eletrólito para  $\text{H}_2\text{SO}_4 1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  
E.C.: 20 g de triptose, 5 g de lactose, 1,5 g de sais biliares, 5 g de cloreto de sódio e q.s.p. 100 mL de água bidestilada.

### 4.2 Eletrodos

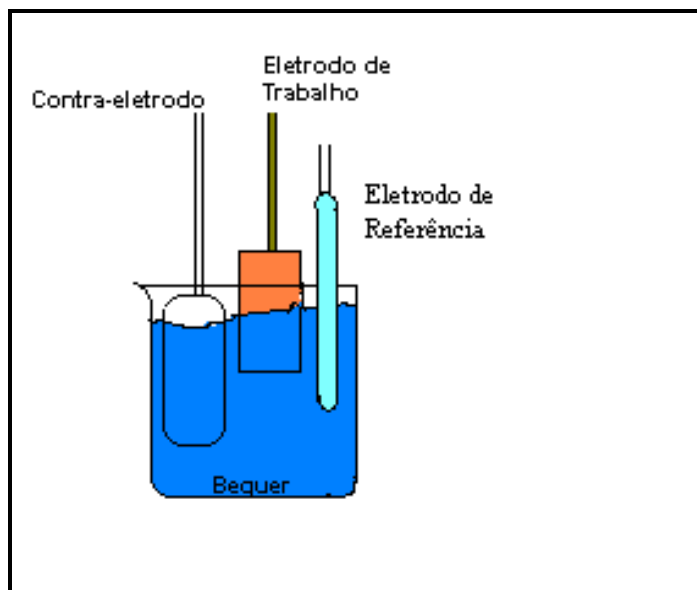
Eletrodos de Trabalho: Aço inoxidável 430 com área média de  $1 \text{ cm}^2$ .

Eletrodo Auxiliar: Platina com área média de  $20 \text{ cm}^2$ .

Eletrodos de Referência: sulfato mercurioso.

### 4.3 Células de trabalho

Para as medidas de polarização e impedância eletroquímica utilizou-se como célula um béquer de 100 mL e sua montagem é verificada na figura 4.1.



**Figura 4.1** – Esquemática da célula de trabalho eletroquímica.

#### 4.4 Equipamentos

- Termômetro escala: -10 a 100°C precisão  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ;
- Potenciostato / impedâncimetro marca: Gamry – PC4/EIS 400;
- Microscópios Ópticos – marca Olympus, modelo metalográfico BX 44 e trinocular BX51;
- Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Shimadzu, modelo SS 550;
- Balança Analítica, marca Metler, precisão de  $8 \times 10^{-4}$  g.

#### 4.5 Temperaturas de Trabalho

Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .



## 4.6 Procedimento Experimental

### 4.6.1 Preparação dos eletrodos de trabalho

Lixa-se a peça metálica utilizando lixas de SiC de granas 220, 400 e 600, sucessivamente. Após se limpar a superfície metálica a mesma é lavada e seca com ar frio.

### 4.6.2 Análise gravimétrica

Amostras retangulares do aço 430, com dimensão de (2 cm x 3 cm)x 0,2 cm de espessura foram polidas e imersas na solução de ácido sulfúrico 1 mol L<sup>-1</sup>, com e sem microorganismos, por diferentes intervalos de tempo ( 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 segundos) e registrada a perda de massa.

### 4.6.3 Potencial de Circuito Aberto (Eca).

Ao investigar os processos de eletrodo é expressamente importante fazer o controle do potencial de equilíbrio. Quando a corrente é nula em medidas eletroquímicas de sistema fechado, tem-se o potencial de pseudo-equilíbrio, também chamado de potencial de corrosão ( $E_{corr}$ ). No  $E_{corr}$ , a velocidade de oxidação é igual à velocidade de redução, portanto a corrente  $J_{ox} = J_{red}$ . Estas medidas foram repetidas no mínimo três vezes.

### 4.6.4 Polarização potencioestática anódica

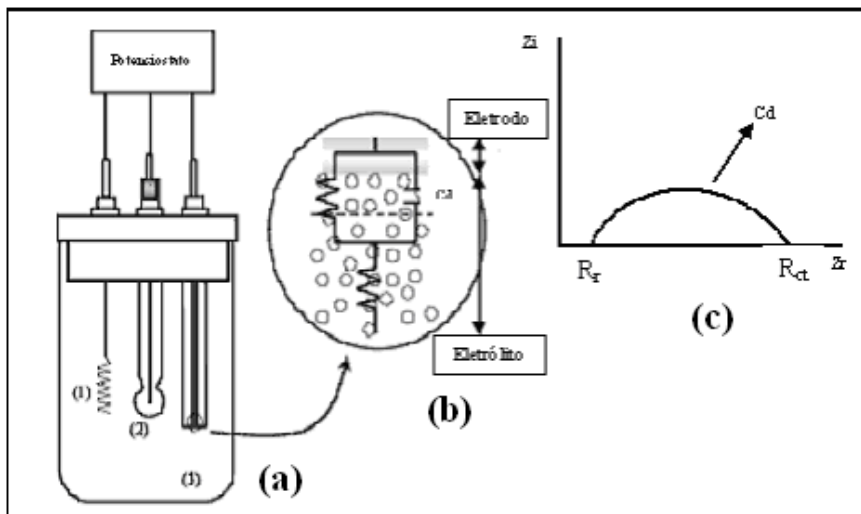
Na polarização potencioestática anódica, as reações de corrosão são controladas predominantemente por polarização nas áreas anódicas. A polarização permite a obtenção de parâmetros cinéticos importantes, para avaliação do desempenho de diversos materiais frente à corrosão, através da polarização de um eletrodo, obtêm-se dados experimentais de densidade de corrente, por unidade de área do eletrodo estudado.

#### 4.6.5 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional [51].

Na EIE surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado).

O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros. A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica apresentada na figura 4.2. [51]



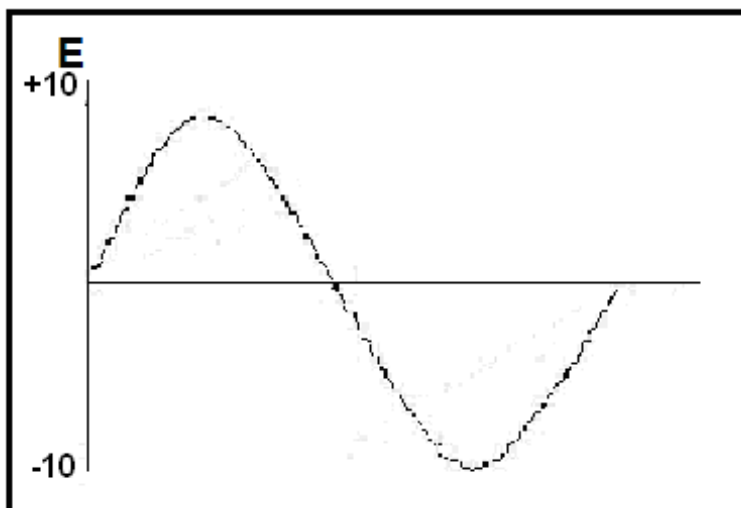
**Figura 4.2** - (a) Célula eletroquímica típica de três eletrodos para uso em EIE: (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de referencia, (3) eletrodo de trabalho. (b) diagrama esquemático de um circuito Randles super imposto à interferência eletrodo/eletrólito. (c) diagrama de EIE do circuito (b) [51].

Uma equivalência típica entre um circuito equivalente e um sistema eletroquímico é apresentado na Figura 4.2. O comportamento similar da dupla camada elétrica a um capacitor de placas paralelas, modelo de Helmholtz [51], e a resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução a um resistor possibilita uma representação da interface por uma associação em paralelo entre um resistor ( $R_{ct}$ ) e um capacitor ( $C_d$ ), devido à contribuição dos processos faradáticos e capacitivos. Uma vez que a corrente que passa na interface eletrodo/solução é conduzida pelos íons em solução, o efeito resistivo na solução sobre a migração dos íons é representado por uma resistência  $R_w$ . Por outro lado, a introdução de elementos capacitivos em um circuito promove uma defasagem entre a corrente e o potencial. Desta forma, uma representação comum para a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é através de um diagrama no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva).

A medida de impedância eletroquímica pode ser feita de modo potenciostático ou galvanostático, sendo que o potenciostático é da seguinte forma:

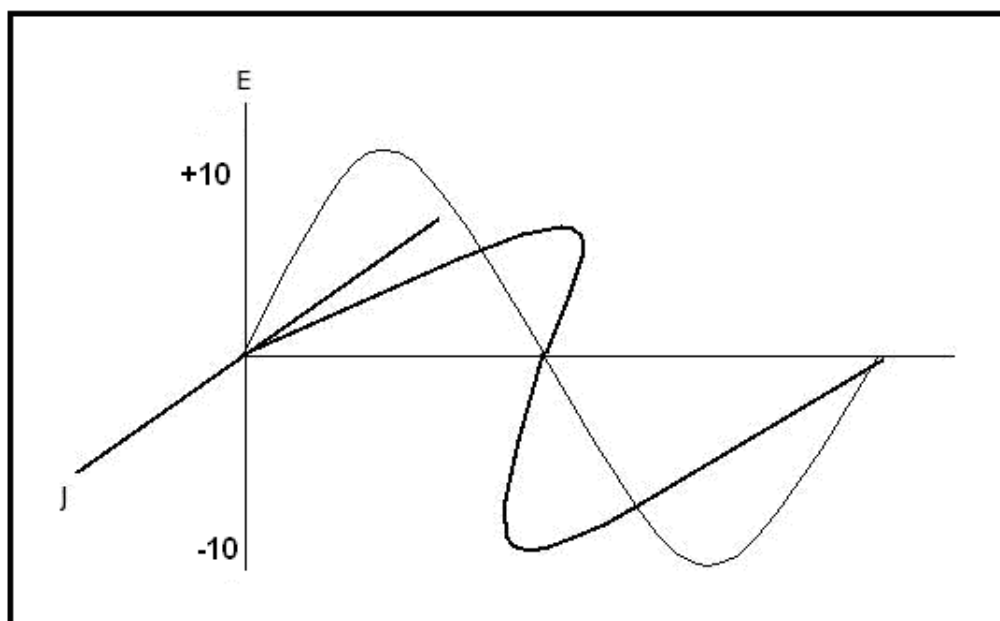
- 1º: Ao se imergir o eletrodo de trabalho na solução problema, inicia-se a medida do potencial de circuito aberto. Após um certo tempo de experimento perceber-se-á a estabilização do potencial de circuito aberto, também chamado de potencial de corrosão. A partir deste potencial de corrosão se escolhe uma  $\eta+$  ou  $\eta-$  para se aplicar no eletrodo de trabalho, normalmente uma  $\Delta\eta$  onde a curva de polarização potencioestática (E vs j) apresenta linearidade.

- 2º: Após a escolha de  $\eta$  a ser aplicado, escolhe-se a perturbação do potencial, por exemplo,  $E_{\text{pert}}$  (potencial de perturbação) de  $\pm 10\text{mV}$  em relação ao potencial de equilíbrio, o potencial será perturbado entre  $-10$  a  $+10\text{mV}$ , ou seja, senoidalmente, como apresentado na figura 4.3.



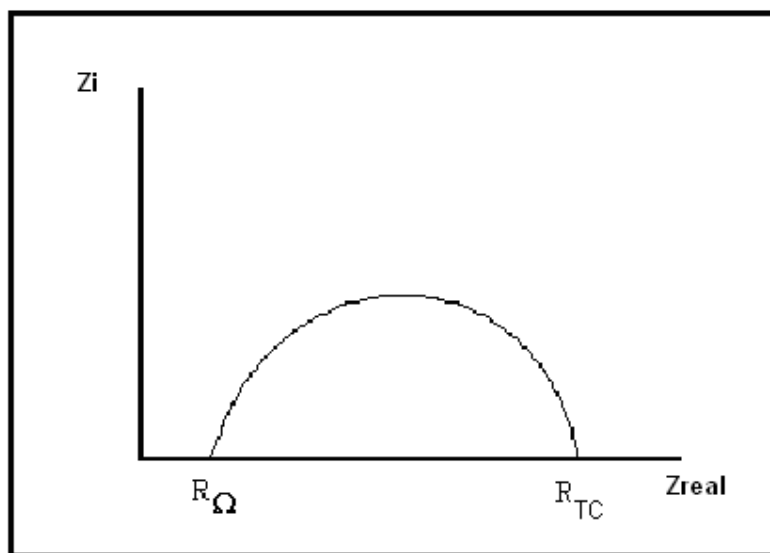
**Figura 4.3** - Perturbação senoidal do potencial E.

A corrente será perturbada senoidalmente na mesma frequência que o potencial, figura 4.4.



**Figura 4.4** - Representação da perturbação do potencial (E) e da densidade de corrente (j).

O resultado das medidas será registrado na faixa de frequência estudada, por exemplo, de 6 kHz a 1 mHz, resultando em um diagrama de impedância eletroquímica, que pode ser feito em relação ao substrato sem o filme depositado e com o filme. A apresentação deste diagrama de EIE pode ser representado na forma Nyquist, como na figura 4.5.



**Figura 4.5** - Diagrama de Nyquist representativo de EIE.

Nota-se na figura 4.5 a existência de duas resistências,  $R_{\Omega}$  e  $R_{TC}$ , chamadas de resistência de solução e de transferência de carga. A resistência de solução distancia-se do zero quanto menor a condutividade da solução, enquanto a resistência de transferência de carga pode aumentar quanto mais resistivo for o filme gerado na superfície do eletrodo de trabalho, ou seja, quanto mais passivo for o metal.

#### 4.6.6 Análise Óptica

Após o polimento e imersão das amostras metálicas no eletrólito com e sem microorganismo, se registra a imagem microscópica da superfície com diferentes aumentos (ex. 50 x, 100 x) por meio de um microscópio óptico com intuito de se analisar a morfologia da superfície e comparar com os resultados gravimétricos e de polarização.

#### 4.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento muito versátil para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação.

A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio óptico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 – 50 Å). Entretanto, não é apenas esta característica que faz do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica [52].

#### 4.6.8 Caracterização do microorganismo

Neste trabalho empregou-se água de um córrego com alta descarga orgânica (esgoto doméstico) para a obtenção de amostras bacterianas. Uma alíquota de 1mL da amostra foi inoculada em um meio nutritivo composto por triptose, lactose, sais biliares, fosfato

monopotássico, fosfato dipotássico, cloreto de sódio e água destilada, sendo incubado por um período de 48 horas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 40°C. Esta temperatura foi mantida para a seleção de bactérias extremófilas (a maioria das bactérias preferem temperaturas de crescimento de 37°C). Após este período, foram preparadas culturas desta amostra em meio ácido (pH=1) em uma diluição de 10% nas seguintes concentrações: 30% de ácido sulfúrico a 0,5 mol L<sup>-1</sup>, 10% do meio nutritivo, 59% de água destilada e 1% de concentrado de bactérias, a qual foi colocada para incubar por 24 horas a 40°C.

Para as primeiras identificações das bactérias que cresceram em meio de pH 1, foi utilizado o Manual BERGEY [53], sendo inicialmente pré-selecionados dois possíveis organismos, na forma de bacilos, sendo os dois Gram negativos e que poderiam crescer nestes parâmetros de pH e temperatura onde se realizaram os experimentos.

A identificação final se deu por meio de caldo específico para o bacilo *Acidithiobacillus thiooxidans*, composto dos seguintes sais: KH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O diluído em água destilada. Já para o bacilo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, utilizou-se o meio composto dos seguintes sais: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10N e água destilada para a diluição.

Os dois meios foram distribuídos em tubos de ensaio e inoculados com 1mL do concentrado obtido do meio nutritivo e incubados em estufa bacteriológica a uma temperatura de 36°C por um período de três a cinco dias. Caso um dos meios oferecer resultado positivo, a solução ficará turva, indicando o resultado para o bacilo especificado.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 - Análise química do aço inoxidável ferrítico tipo ABNT 430

Na tabela 5.1 é relatada a composição química do aço inoxidável ferrítico tipo ABNT 430 utilizado no desenvolver deste trabalho.

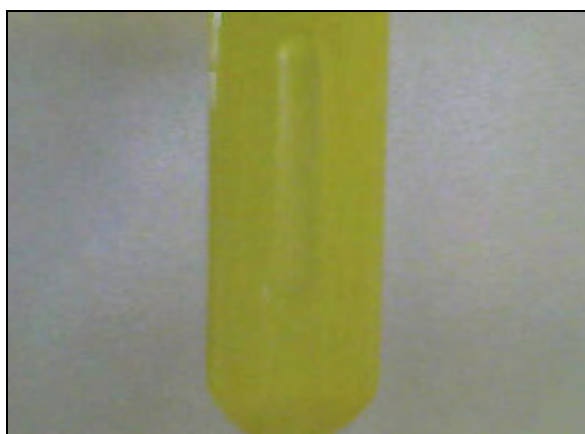
**TABELA 5.1** - Composição química em percentagem em peso do aço inoxidável ferrítico tipo ABNT 430.

Elemento	C	Cr	Ni	Mn	Si	Co	Mo	S	V
% m/m	0,30	17,60	0,23	0,50	1,23	0,50	0,28	0,25	0,40

Esta análise química foi realizada pela Villares Metals.

### 5.2 Ensaios de identificação microbiológica

O preparo da solução concentrada de micro-organismos é observado na figura 5.1.

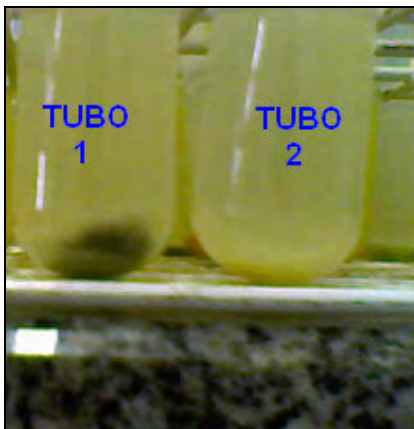


**Figura 5.1** - Tubo de concentrado de micro-organismos.

Conforme descrito no procedimento experimental: duas alíquotas de 1 mL do concentrado da figura 4.1, foram retiradas e colocadas em dois outros tubos para análise e inoculação de *Acidithiobacillus Thiooxidans* (TUBO 1) ou *ferrooxidans* (TUBO 2).

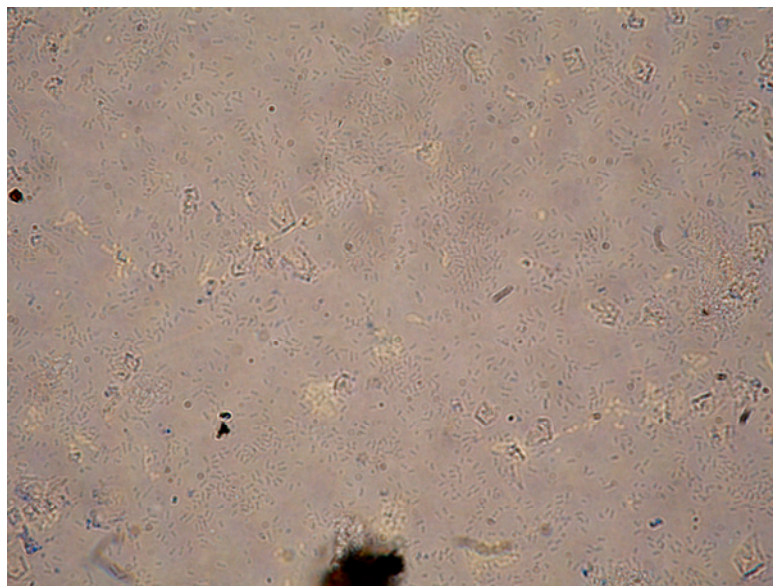


Após o período de inoculação de 48 horas o resultado foi positivo para a bactéria *Acidithiobacillus Thiooxidans*, através da degradação do enxofre e a turvação do meio de cultura, vide figura 5.2.



**Figura 5.2** - Inoculação do micro-organismos para: TUBO 1 - *Acidithiobacillus thiooxidans* e TUBO 2 - *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Para uma identificação mais precisa, foram preparadas quatro lâminas para microscopia, sendo todas coradas com a utilização de azul de metileno a 1%, e visualizado em microscópio óptico trinocular com captura de imagens em tempo real, através de câmara digital em um aumento de 1000x, vide figuras 5.3.



**Figuras 5.3:** Bactéria *Acidithiobacillus Thiooxidans* em aumento de 1000x com óleo de imersão.

Nota-se nas figuras 5.3, que as bactérias da espécie *Acidithiobacillus Thiooxidans* são organismos unicelulares e com formatos de **bastão**, com valor estimado de 1,0 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. [53]

### 5.3 Ensaios gravimétricos e de microscopia óptica

Após realização dos ensaios gravimétricos na ausência e presença de microorganismos, executou-se o cálculo médio da perda de massa se calculou a velocidade corrosão do material em diferentes intervalos de tempo de imersão da amostra do aço, a partir da equação I.

$$V_{corr} = \frac{\Delta m}{A.t} \quad (\text{equação I})$$

Onde:

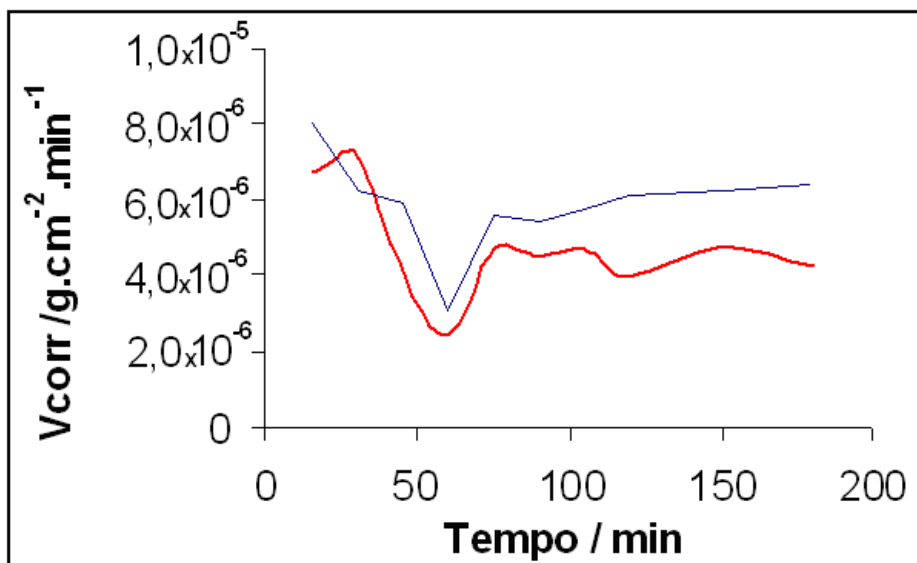
$V_{corr}$  = velocidade de corrosão ( $\text{g. cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ );

$\Delta m$  = variação da massa ( $m_i - m_f$ ), ou seja  $m_i$  = massa em gramas antes da imersão e  $m_f$  = massa final da placa em grama após ensaio gravimétrico;

$A$  = área média da placa de aço ( $\text{cm}^2$ );

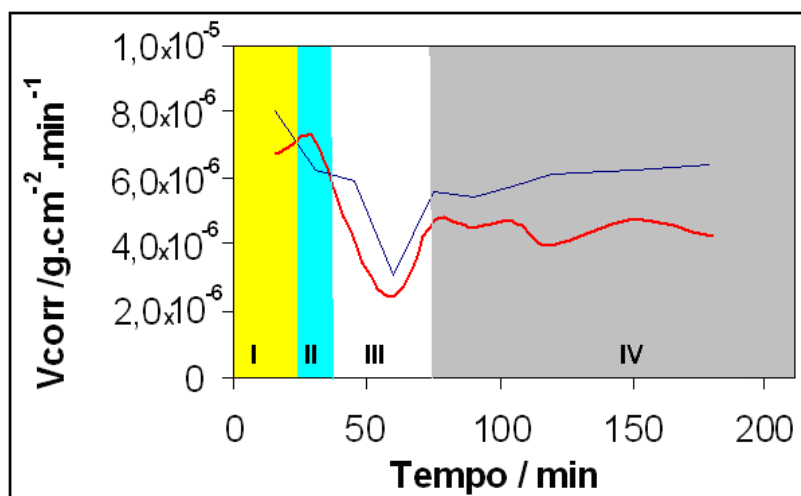
$t$  = tempo de imersão da placa (min).

Os resultados das medidas gravimétricas são apresentados na figura 5.4.



**Figura 5.4** - Curvas gravimétricas para o aço inoxidável 430 imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , (—) sem e (—) e com microorganismos

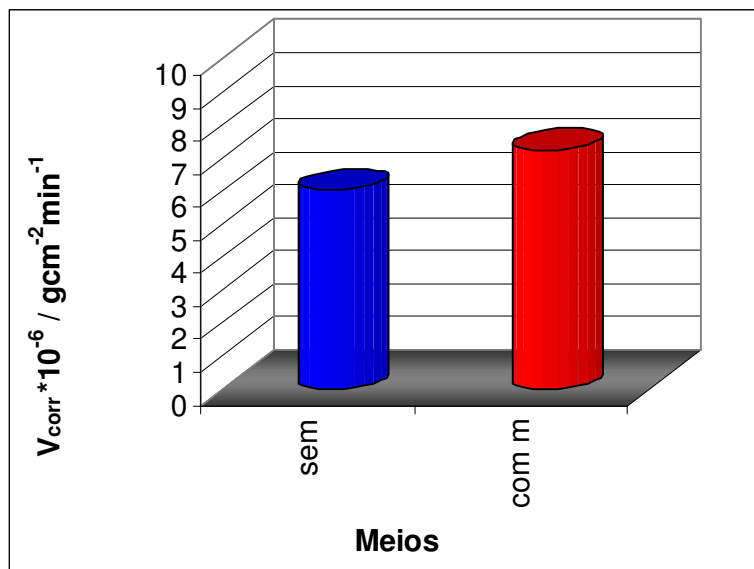
Verifica-se na figura 5.4 que para o aço inoxidável 430 imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , na presença e ausência de microorganismos, percebe-se que generalizando há uma oscilação da velocidade de corrosão na presença dos microorganismos em relação ao sistema sem os mesmos, sendo melhor representada na figura 5.5.



**Figura 5.5** - Curvas gravimétricas para o aço inoxidável 430 imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , (—) sem e (—) com microorganismos.

- Fase I:** Nos primeiros instantes, até aproximadamente 25 minutos há uma redução da velocidade de corrosão do sistema com microorganismos em relação ao sem microorganismos, isso pode ser provavelmente devido à presença de microorganismos na superfície do aço;
- Fase II:** Entre 25 e 38 minutos há um aumento da velocidade de corrosão em relação ao sistema sem microorganismos, isso pode ser provavelmente devido à nucleação do biofilme em áreas preferenciais da superfície do aço, gerando como se fossem micro-pilhas e acelerando o processo corrosivo do metal base;
- Fase III:** Dos 38 aos 75 minutos a velocidade de corrosão volta a diminuir na presença de microorganismos, provavelmente o biofilme seja gerado por quase toda superfície do metal causando um bloqueio em relação ao eletrólito minimizando a velocidade de corrosão;
- Fase IV:** Após 75 minutos nota-se que a velocidade de corrosão oscila, provavelmente devido à ruptura do biofilme em certas regiões da superfície do metal e em seguida volta a se estabilizar.

O comportamento da velocidade de corrosão averiguado para o sistema contendo microorganismos ser menor do que o observado para o sistema sem m, pode ser por que o procedimento de pesagem das placas de aço 430 nas medidas gravimétricas, eram feitos apenas de lavagem com água e secagem, e possivelmente o biofilme gerado ficava na superfície gerando um ganho de massa. Novos experimentos gravimétricos foram executados em um tempo superior a 5 horas, ou seja 300 minutos, os corpos de prova após este tempo de imersão foram enxaguados com hipoclorito 10 %, água e após secos com ar frio, os resultados são apresentados na figura 5.6.



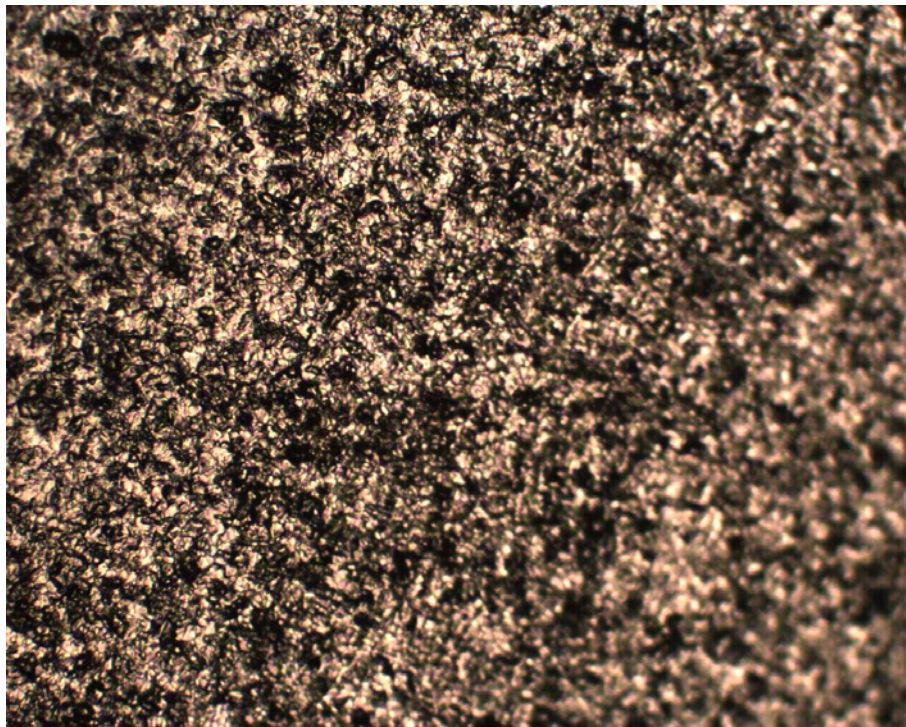
**Figura 5.6** – Velocidade de corrosão para o para o aço inoxidável 430 após 5 horas de imersão em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , sem (—) e com (—) microorganismos.

Os resultados apresentados na figura 4.6 mostram que na presença de m há uma aceleração do processo oxidativo do aço 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Outra importante análise sobre os resultados das figuras 5.4 e 5.6. é verificado que a dissolução do aço aumenta como tempo, ou seja na ausência ou presença do microorganismo a corrosão deste aço em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  é de ordem zero, sugerindo que o mecanismo de geração do biofilme do microorganismo na superfície do aço 430 também seja de ordem zero.

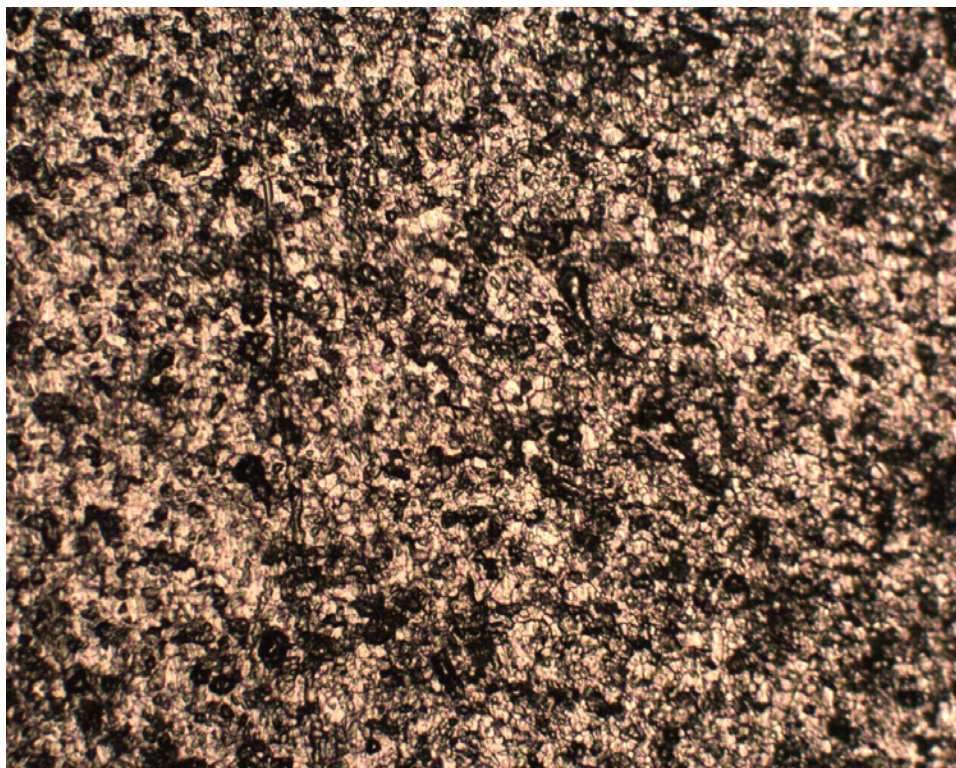
Ensaio óptico foram realizados para amostras do aço 430 e são mostradas na figura 5.7 (A) a (C).



**(5.7 - A) Aumento de 200 x.**



**(5.7 - B) Aumento de 200 x.**

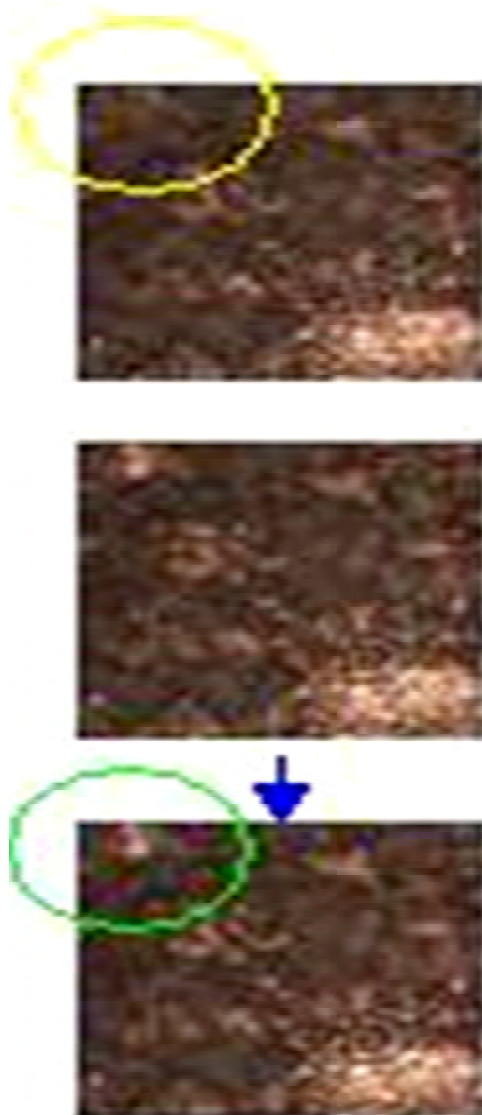


(5.7 – C) Aumento de 200 x.

**Figura 5.7** - Fotomicrografias ópticas da amostra de aço 430 polida (A), com imersão de 180 minutos em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , sem (B) e com microorganismos (C).

Verifica-se através das fotomicrografias ópticas apresentadas na figura 5.7, que as amostras de aço 430 no meio com e sem microorganismos, estão bem oxidadas. Deve-se ressaltar que os microorganismos aderem inicialmente à superfície criando um biofilme que não pode ser visto com esta técnica óptica.

A nucleação de biofilmes na superfície do aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$  é registrada na Figura 5.8.



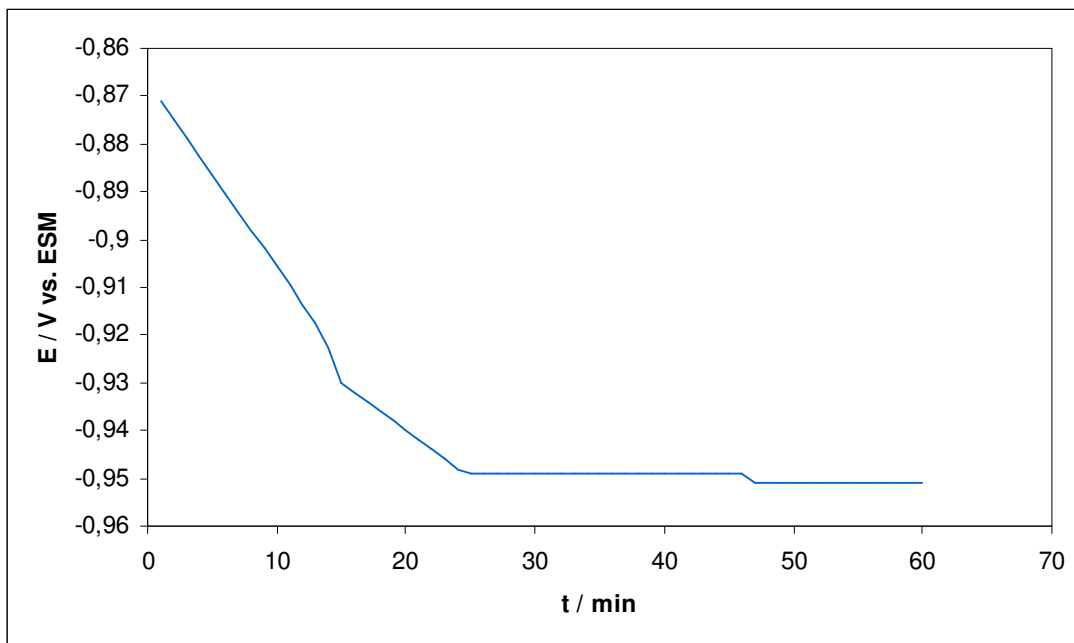
**Figura 5.8** - Micrografias ópticas de 5 em 5 segundos, da nucleação de biofilme na superfície do aço inoxidável 430 após imersão em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com microorganismos, aumento de 200x: (●) ponto inicial de uma nucleação, (●) ponto após 30 segundos.

Na figura 5.8 nota-se que na região do círculo amarelo, nos primeiros segundos não existe nucleação de biofilme na superfície do aço 430, após 30 segundos no círculo verde, observa-se a nucleação do biofilme.



### 5.4 Ensaios Eletroquímicos

Medidas de potencial de circuito aberto foram levantadas para os sistemas em estudo e são apresentadas na figura 5.9 e na tabela 5.2.



**Figura 5.9** – Curva de potencial de circuito aberto para o aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , sem microorganismos.

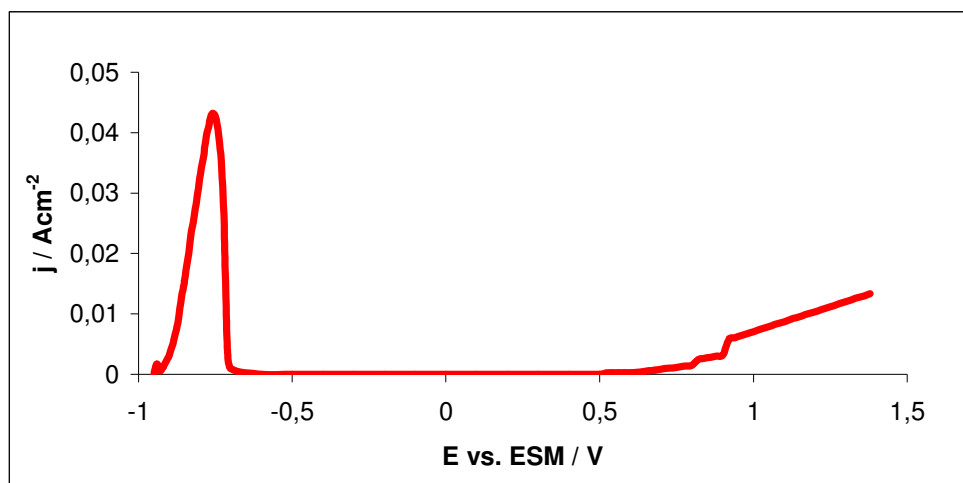
Nota-se na figura 5.9 que a evolução do potencial de circuito aberto para o aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  é no sentido catódico. Tal comportamento é semelhante para o sistema contendo *m* e o valor de  $E_{\text{corr}}$  para os dois sistemas é muito parecido, vide tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Potenciais de corrosão do aço 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  sem e com microorganismos.

$\text{H}_2\text{SO}_4$ $1 \text{ mol L}^{-1}$ com E.C.	$E_{\text{corr}}$ (V) vs. ESM
Sem <i>m</i>	$-0,949 \pm 5$
Com <i>m</i>	$-0,943 \pm 5$

A tabela 5.2 mostra que com a adição de microorganismos em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , o valor do potencial de corrosão não sofreu alteração significativa.

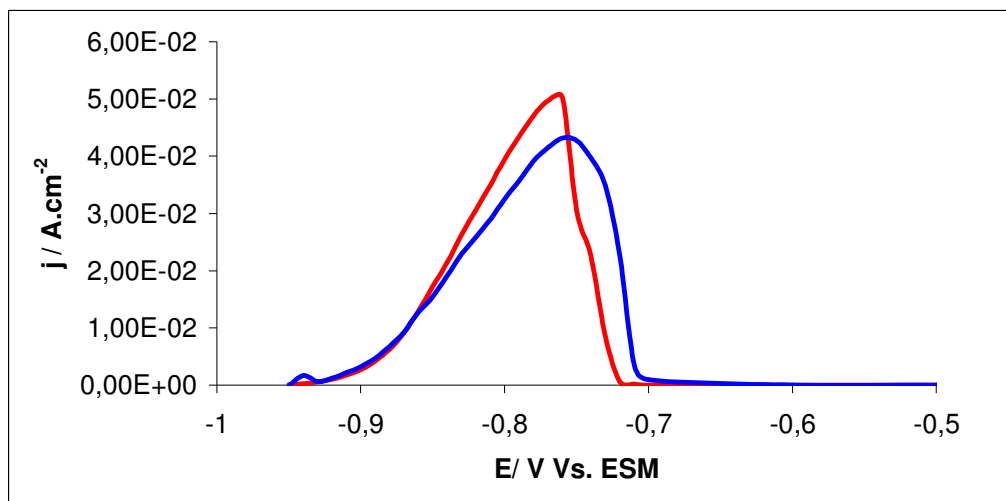
Curvas de polarização potencioestática anódica foram levantadas para os sistemas em estudo e são apresentadas nas figuras 5.10 a 5.12.



**Figura 5.10** – Curva de polarização potencioestática anódica para o aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , com microorganismos.

Analisando a curva de polarização potencioestática anódica para o aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  sem microorganismos, nota-se a existência de região ativa, passiva e transpassiva, regiões estas citadas na figura 3.1.

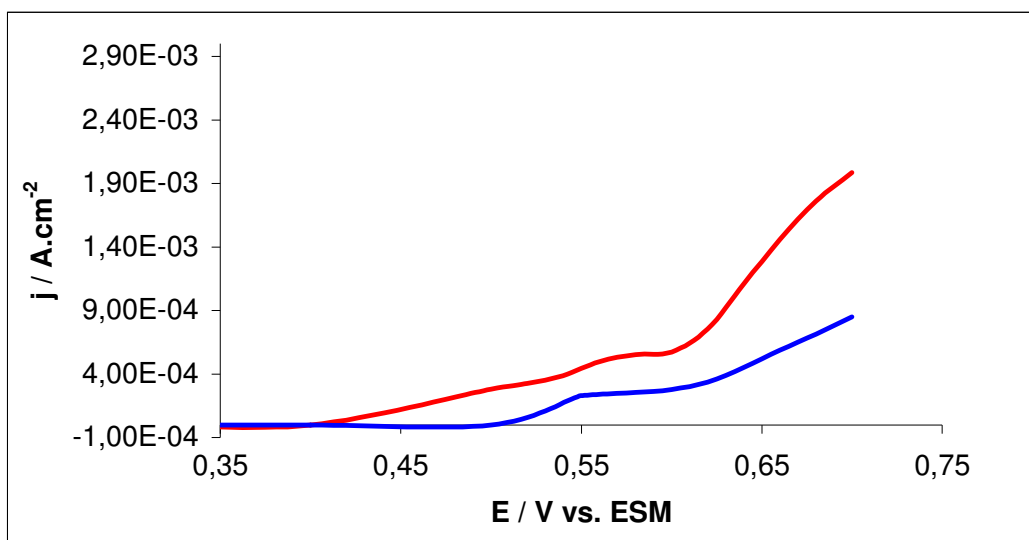
Nas figuras 5.11 e 5.12 são apresentadas as regiões ativa e transpassiva das curvas de polarização potencioestáticas anódica para o aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , com e sem microorganismos, nota-se a existência de região ativa.



**Figura 5.11** - Região ativa de curvas de polarização potencioestática anódica do aço inox 430 em de  $H_2SO_4$   $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ , (—) sem e (—) com microorganismos.

Verifica-se na figura 5.11 que a adição de microorganismos ao sistema aumenta a densidade de corrente, mostrando que os microorganismos possuem um efeito catalítico na oxidação do aço inox 430 em meio de  $H_2SO_4$   $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  nos primeiros potenciais. Entretanto, ao se atingir o potencial de pico nota-se a redução da densidade de corrente em relação ao sistema sem microorganismos, possivelmente o biofilme facilite o processo de passivação do aço 430, região para a qual a curva anódica se direciona.

Curvas de polarização potencioestática anódica na região transpassiva para os sistemas em estudo são apresentadas na figura 5.12.

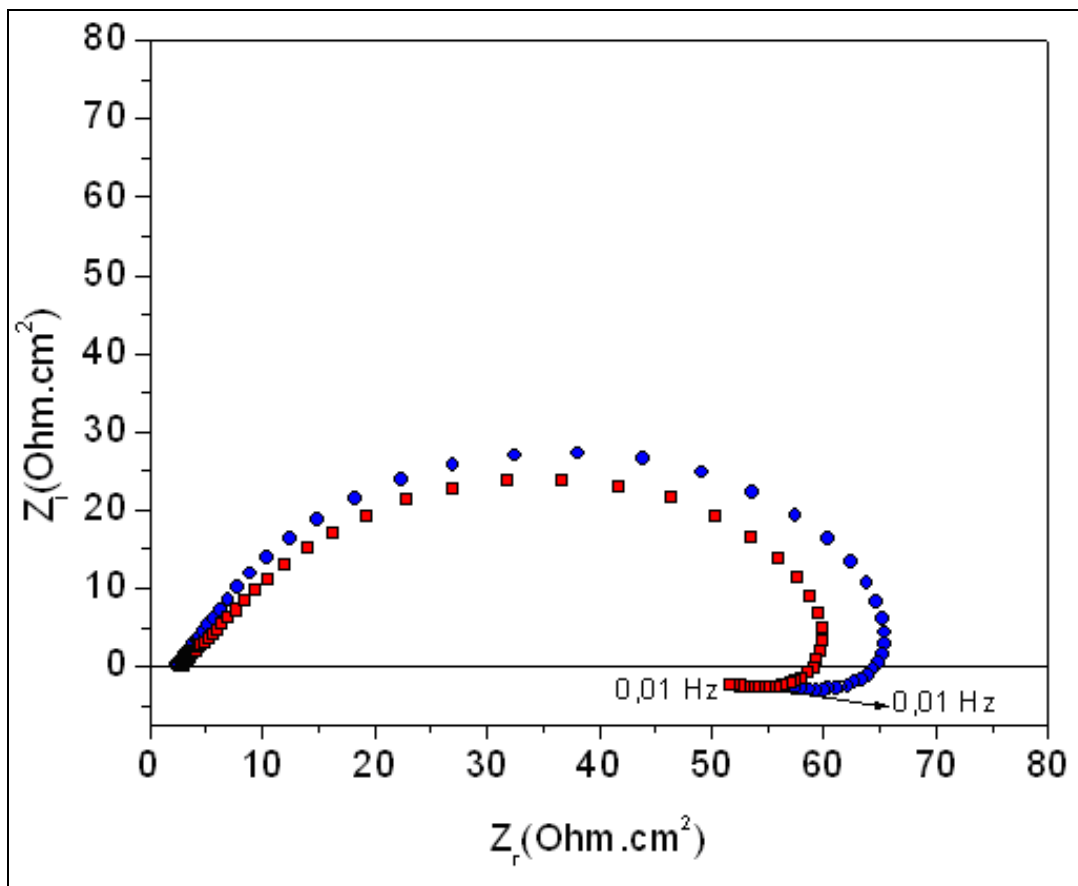


**Figura 5.12** - Região transpassiva das curvas de polarização potencioestática anódica do aço 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , (—) sem e (—) com microorganismos.

Na figura 5.12 verifica-se que na região transpassiva, que o sistema contendo microorganismos apresenta maior densidade de corrente.

Os resultados das figuras 5.10 a 5.12 sugerem que o biofilme formado na superfície do aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , pode acelerar o processo de oxidação do aço, provavelmente devido à geração de micro-pilhas geradas pela nucleação, (início da região ativa) ou pelo deslocamento do biofilme (região transpassiva).

Diagramas de impedância eletroquímica tipo Nyquist e de ângulo de fase de Bode são apresentados nas figuras 5.13 e 5.14.

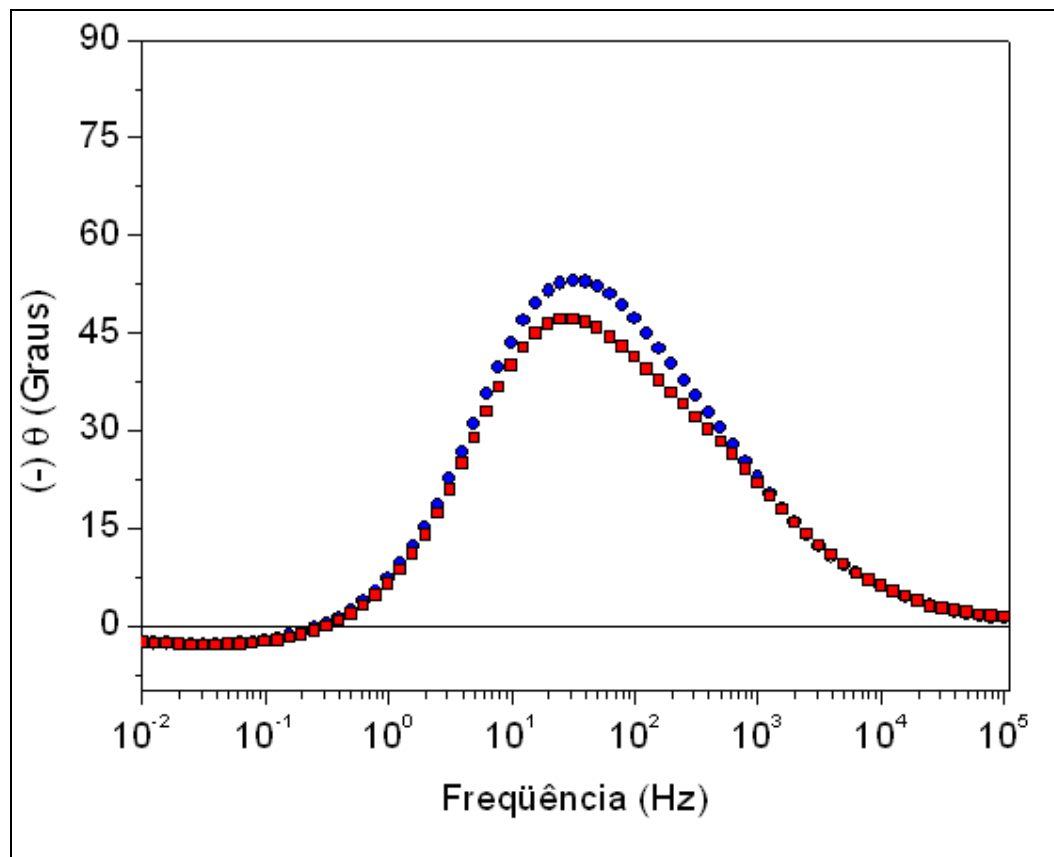


**Figura 5.13** - Diagramas de Nyquist no  $E_{corr}$  para o aço inoxidável 430 em  $H_2SO_4$  1 mol  $L^{-1}$ , (♦) sem microorganismos e (■) com microorganismos.

Os valores de impedância da figura 5.13 mostram que o material não está passivo, uma vez que se registra um arco capacitivo completo. Nota-se a existência de um arco indutivo, que é atribuído a uma corrosão intensa no material metálico. [59]

O arco indutivo normalmente é atribuído a meios que tem adsorção ou a meios agressivos, impedâncias baixas normalmente justificam o efeito indutivo de dissociação.

Verifica-se que no meio contendo microorganismos houve uma diminuição no tamanho do arco em relação ao meio que não os continha, mostrando que a corrosão é mais acentuada para o meio com microorganismos.



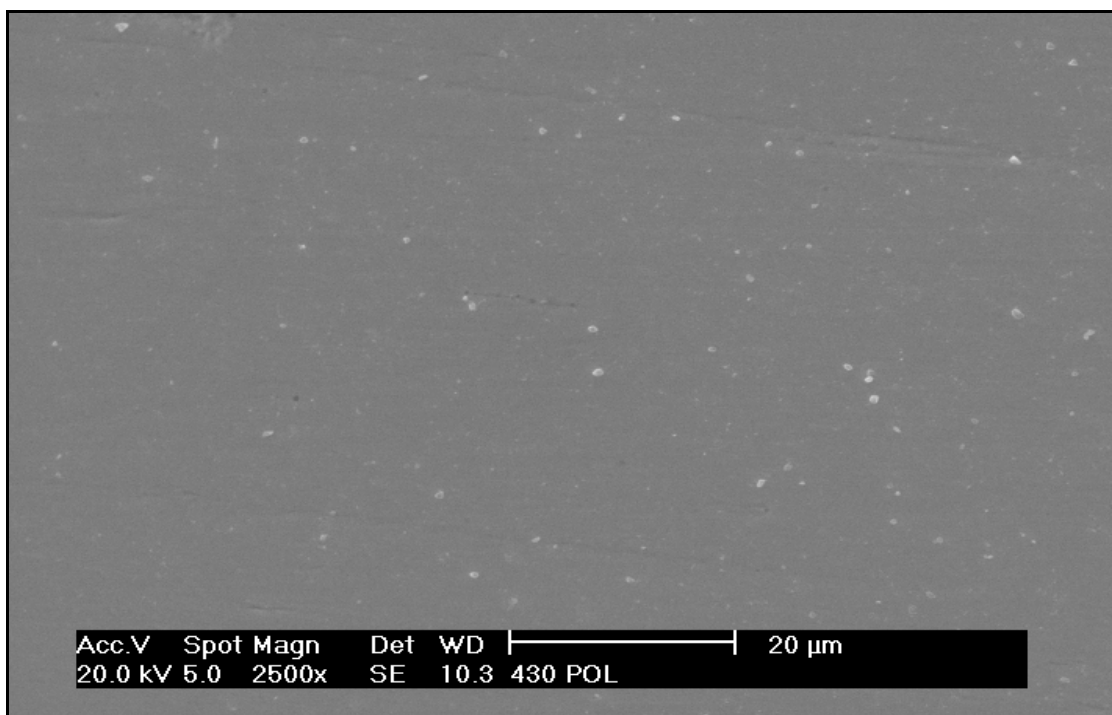
**Figura 5.14** - Diagramas de ângulo de fase Bode no  $E_{\text{corr}}$  para o aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , (♦) sem e (■) com microorganismos.

Observa-se na Figura 5.14 uma constante de tempo em freqüências próximas de 100 Hz a 10Hz, indicando transferência de carga na superfície. Os maiores ângulos de fase foram medidos para o sistema sem microorganismos.

A presença do arco indutivo de Nyquist pode ser confirmada pela obtenção de ângulos de fase negativo em freqüências abaixo de 0,1 Hz.

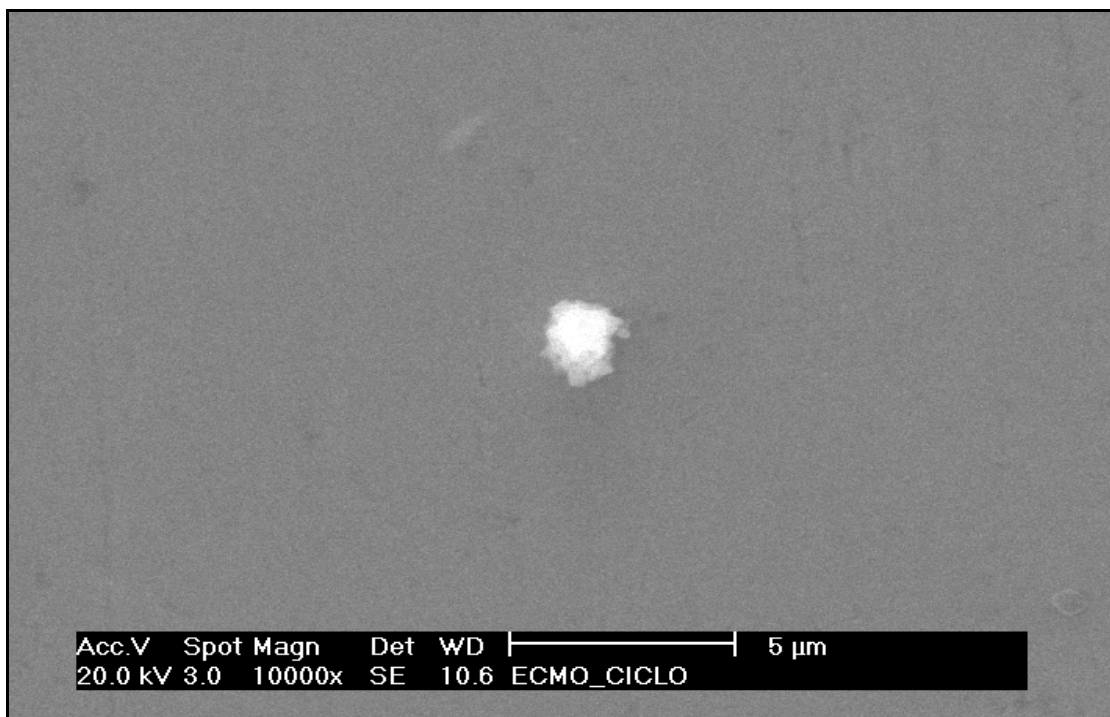
### 5.5 Ensaios de microscopia eletrônica de varredura

Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície do aço 430 polida, após imersão nos diferentes meios estudados e após a execução da polarização cíclica, foram executadas e são apresentadas nas figuras seguintes.

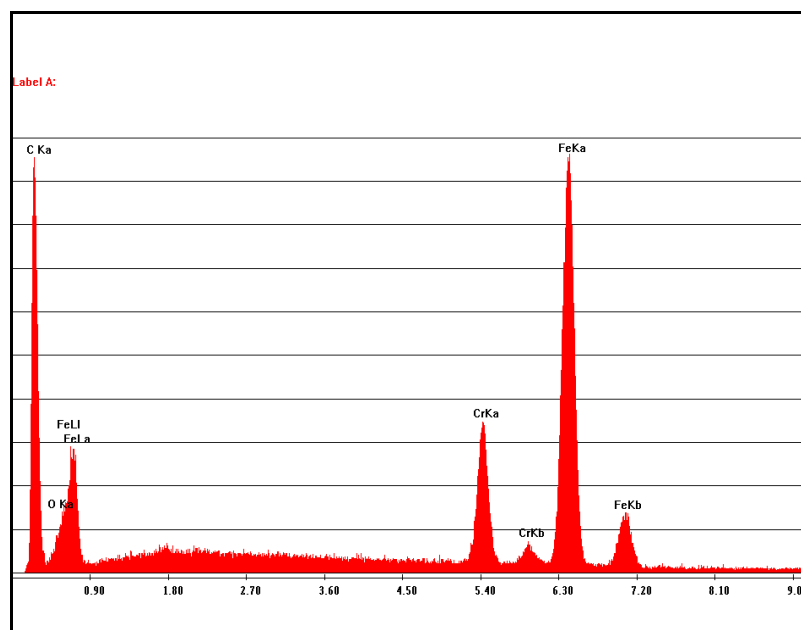


**Figura 5.15** – Imagem gerada por microscópio eletrônico de varredura para o aço inoxidável 430 com a superfície polida até pasta diamante de 1 µm.

Na figura 5.15 nota-se a presença de inclusões “brancas”, poucas alongadas características de MnS e muitas arredondadas características de óxidos [54]. Para se evidenciar qual o tipo de óxido fez uma análise via EDAX de uma das inclusões, figura 5.16, o resultado é apresentado na figura 5.17.



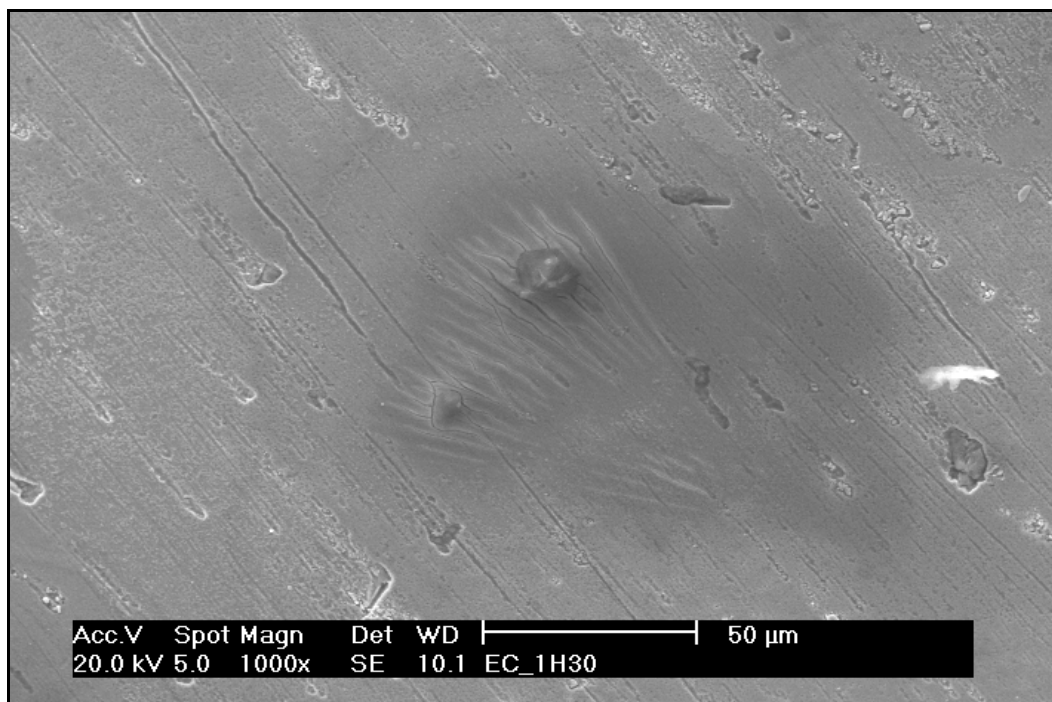
**Figura 5.16** – Imagem gerada por microscópio eletrônico de varredura para o aço inoxidável 430 com a superfície polida até pasta diamante de 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.17** – Análise por EDAX da inclusão da figura 5.16.

Verifica-se na figura 5.18 que a inclusão parece ser de um óxido misto de cromo e ferro.





**Figura 5.18** – Imagem gerada por microscópio eletrônico de varredura para o aço inoxidável 430 após imersão por 1 hora em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> sem microorganismos.



**Figura 5.19** – Imagem gerada por microscópio eletrônico de varredura para o aço inoxidável 430 após imersão por 1 hora em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> com microorganismos.

Verifica-se na microscopia da figura 4.19 em relação à figura 4.18 que na presença de microorganismos, o metal base apresenta-se bem oxidado com a geração de um biofilme na superfície do aço.

Novas imagens da superfície por MEV do aço 430 foram geradas após dois tipos diferentes de polarizações anódica na região passiva:

**1º Polarização anódica Estática:** aplica-se um potencial (E) fixo de 0 V, por 3000 segundos, ao eletrodo de trabalho de aço 430 em relação ao eletrodo de referência sulfato mercurioso (ESM), imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , (♦) com microorganismos. Para melhor entendimento a esquematização desta polarização é apresentada na figura 4.20.

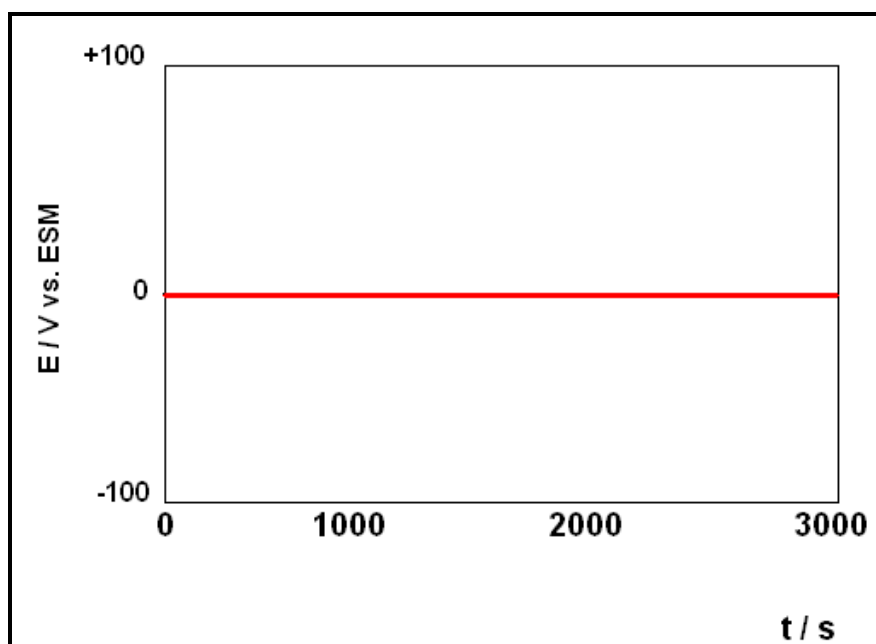
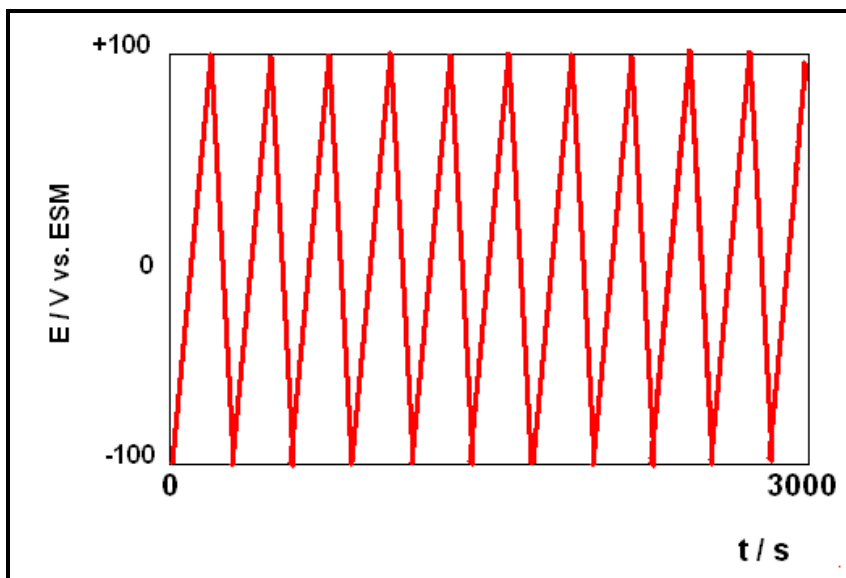


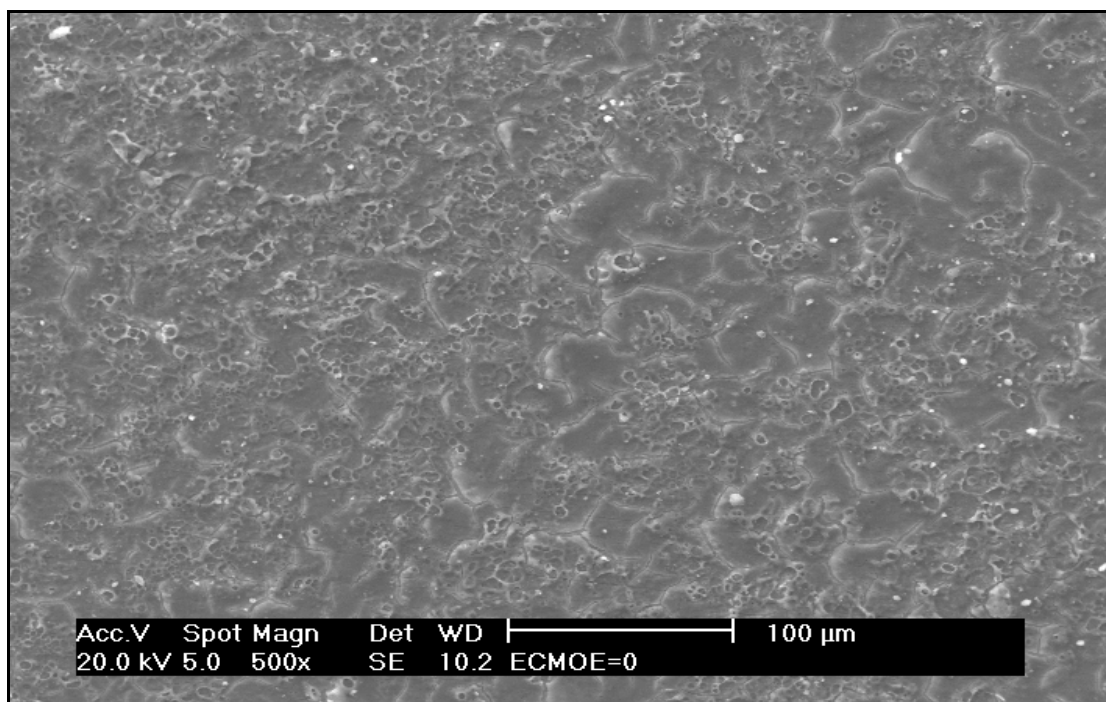
Figura 5.20 – Representação esquemática da polarização anódica estática para o aço 430 imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , (♦) com microorganismos.

**2º Polarização anódica cíclica (PAC):** aplica-se um potencial variável de  $\pm 100$  mV, por 3000 segundos, ao eletrodo de trabalho de aço 430 em relação ao eletrodo de referência sulfato mercurioso (ESM), imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , (♦) com microorganismos. Velocidade de varredura de  $0,2 \text{ mVs}^{-1}$ . Para melhor entendimento a esquematização desta polarização é apresentada na figura 5.21.

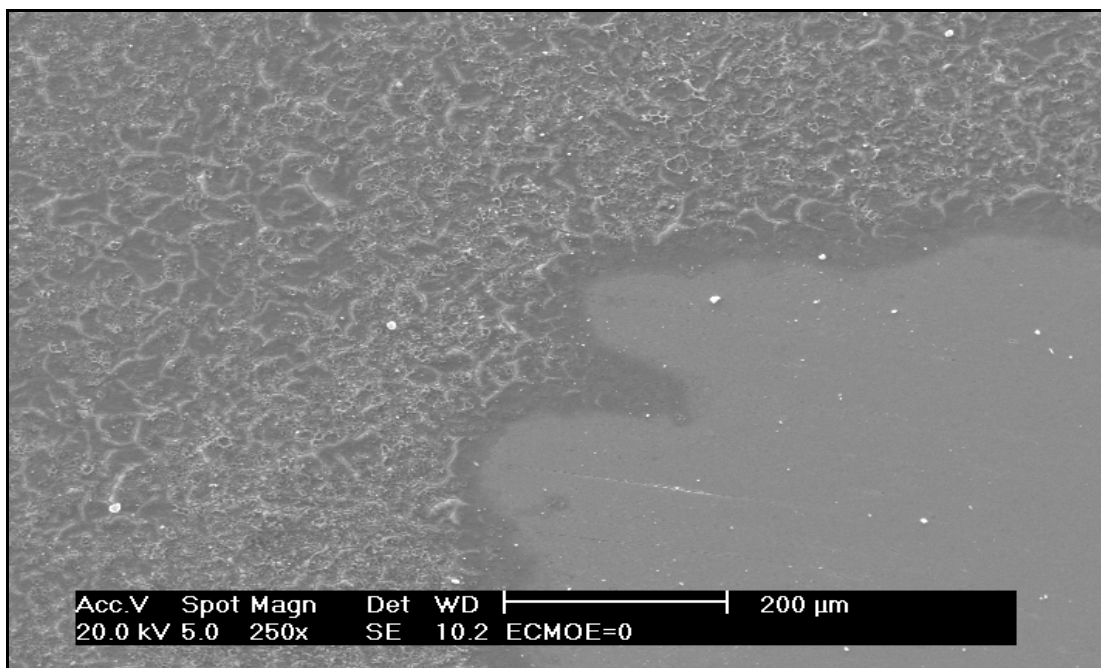


**Figura 5.21** – Representação esquemática da polarização anódica cíclica para o aço 430 imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , (♦) com microorganismos.

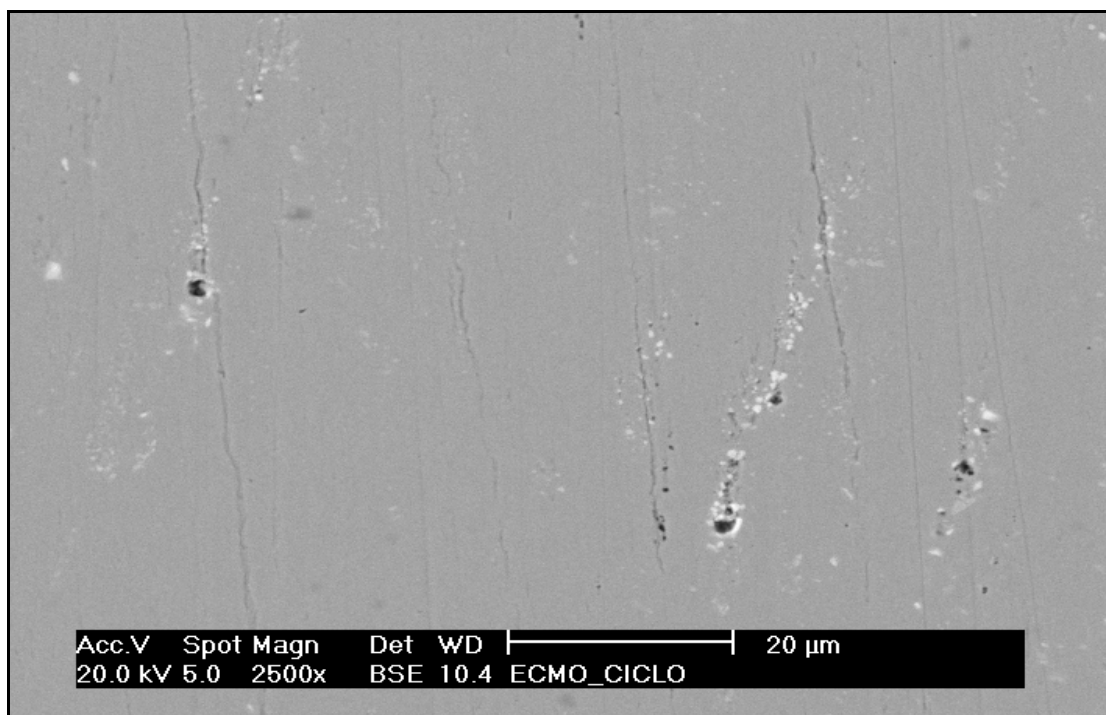
As imagens geradas do aço 430 após as polarizações citadas anteriormente são apresentadas nas figuras 5.22 a 5.24.



**Figura 5.22** - Microscopia eletrônica de varredura da superfície do aço 430 após imersão em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  com microorganismos, e polarização anódica estática.



**Figura 5.23** - Microscopia eletrônica de varredura da superfície do aço 430 após imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> com microorganismos, e polarização anódica estática.



**Figura 5.24**- Microscopia eletrônica de varredura da superfície do aço 430 após imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> com microorganismos, e polarização anódica cíclica. Aumento de 2500x.

Verifica-se nas figuras 5.22 e 4.23, que na polarização anódica estática, a nucleação do biofilme no substrato metálico continua a ocorrer, enquanto que na figura 4.24 nota-se que a polarização anódica cíclica, PAC, impede a nucleação dos microorganismos na forma de biofilme na superfície do aço 430, imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , desta forma agindo como um processo inibidor da corrosão microbiológica para este aço no meio estudado. Outra importante observação em relação a figura 5.24 é em relação a existências de buracos na superfície do metal, após a PAC, isto provavelmente ocorre devido a dissolução de algumas inclusões pré-existentes no aço 430.

## 6 - CONCLUSÕES

- O microorganismo retirado do rio e empregado nas medidas experimentais deste trabalho é o *Thiobacillus Thiooxidans*;
- O *Thiobacillus Thiooxidans* gera biofilmes na superfície do metal, sendo que nos primeiros 25 minutos há a diminuição da velocidade de corrosão do aço 430, imerso em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , mas após esse tempo a intensidade de corrosão aumenta e depois volta a diminuir. Esta oscilação é atribuída a geração e rompimento do biofilme na superfície do aço 430;
- Nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica há uma diminuição da resistência de polarização do aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com *Thiobacillus Thiooxidans*, sugerindo uma aceleração do processo corrosivo;
- A polarização anódica potenciostática do aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com *Thiobacillus Thiooxidans* favorece a formação de um biofilme na superfície metálica;
- A polarização anódica cíclica (PAC) do aço inoxidável 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com *Thiobacillus Thiooxidans*, dificulta a formação do biofilme, podendo ser utilizada como processo inibidor de corrosão microbiológica para este aço neste meio;
- A corrosão do aço 430 em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com *Thiobacillus Thiooxidans*, é do tipo generalizada, entretanto quando se aplica a PAC nota-se a dissolução de pontos preferenciais, ou seja, localizados. Esses pontos de corrosão localizados são atribuídos a dissolução das inclusões presentes no material metálico.

## 7 - SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Trabalhar com diferentes microorganismos e com variação de pH (6, 7 e 8);
- Estudar a aplicação de biocidas e a eficiência da bioeletroquímica aplicada à inibição de biofilmes em superfície de metais;
- Estudar pós-aplicação da bioeletroquímica e do biocida a contagem de microorganismos em diferentes diluições.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Rodrigues, P. R. P. – “*O Benzotriazol como inibidor de corrosão para ferro e ligas ferrosas em meios de ácido sulfúrico*”, Tese de doutorado apresentada ao IQUSP, 2007;
- 2- Mário Carbó, H.. Catálogo Acesita. *Aço Inoxidável Aplicações e especificações*, volume único, 2001;
- 3- Noemi. Gonçalves, I. Catálogo Acesita, 3. ed. *Características Básicas e Cuidados dos Aços Inoxidáveis*, volume único, 2001;
- 4- CUNHA. M.T , **Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo**, Brasil, 2003;
- 5- RAINHA, V. L. e FONSECA, I. T. E.; **Corrosion Science**, Vol. 39, Nº. 4, pp. 807-813, 1997;
- 6- JONES, Denny A. **Principles and prevention of corrosion**. 2<sup>a</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996;
- 7- W. P. Iverson, **Adv. App. Microbial.** 32, 1,1987;
- 8- W. Sand, **Werkstoffe und korrosion** 45, 10, 1994;
- 9- C.A.H. Von Wolzogen Kuhr and L.S. Van der Vlugt, **Water (The Hague)** 18, 147,1934;
- 10- B. Little, P. Wagner and F. Mansfeld, *Electrochim. Acta* 37, 2185, 1992;
- 11- T. Ford and R. Mitchell, *Adv. Microbial. Ecology*,11, 231, 1990;
- 12- R.A. King and J.D.A. Miller, *Nature* 233, 491, 1971;
- 13- J.A. Costello, *South Afr. J. Sci.*,70, 202, 1974;
- 14- V. Gentil, *Corrosão*. 4<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1987;
- 15- Myers et al, *Environmental services of biodiversity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(7): 2764-2769, 1996;



- 16- Schimel et al, *Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure*. Ecol. Stud., 113: 239-254, 1995;
- 17- Staley, J. T. & Gosink, J.J.. *Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 53: 189–215,1999;
- 18- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin Scott, H. M. *Microbial biofilms*. Annu. Rev. Microbiol. 45, 711-745, 1995;
- 19- Characklis, W. G., Marshall, K. C. *Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach*. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C (eds) *Biofilms*. John Wiley and Sons Inc. New York, 1990;
- 20- Characklis, W. G., Wilderer, P. A. *Structure and Function of Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, 1989;
- 21- Flemming, H. C. *Biofouling in water treatment*. In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Heidelberg, Springer-Verlag, 47-80, 1991.
- 22- Nascimento T., Taveira N. “ *Os Biofilmes Microbianos como Agentes Causais de Doenças Humanas*”, **Revista o Biólogo**, Ed. Universidade de Lisboa , Instituto Superior de Ciências da Saúde – Sul – 2003.
- 23- R.A. Atlas, R. Bartha, **Microbial Ecology: Fundamentals and Application**, fourth ed., Addison Wesley Longman, pp. 425–437, 1998;
- 24- E. Vincke, E.V. Wanseele, J. Monteny, A.N.D. Belie, Influence of polymer addition on biogenic sulphuric acid attack of Beeldens concrete, **International Deterioration and Biodegradation**, 49, 283–292, 2002;
- 25- A.F. Idriss, S.C. Negi, J.C. Jofrier, G.L. Hayward, Effect of hydrogen sulphide emissions on cement mortar specimens, **Canadian Biosystem Engineering**, 43, 25–28, 2001;

- 26- TPC 12 NACE International, Coal tar epoxy coating – a state of the art review, Houston, TX [8] **Ameron International, T-Lock PVC sheet liner for concrete pipe and structures** R9-96, Brea, 1996;
- 27- A. Beeldens, J. Monteny, E. Vincke, N. De Belie, D. Van Gemert, L. Taerwe, W. Verstraete, Resistance of biogenic sulphuric acid corrosion of polymer-modified mortars, *Cement and Concrete Composites*, 23, 47–56, 2001;
- 28- N. De Belie, J. Monteny, A. Beeldens, E. Vincke, D. Van Gemert, W. Vestraete, Experimental research and prediction of the effect of chemical and biogenic sulphuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes, **Cement and Concrete Research**, 34, 2223–2236, 2004;
- 29- J. James, Controlling sewer crown corrosion using the crown spray process with magnesium hydroxide, in: **Underground Construction Technology Conference**, Houston, TX, 2003;
- 30- S.Vaidya, C. Montes, E.N. Allouche, **Use of Nanomaterials for Concrete Pipe Protection, in: International Pipelines Conference**, The Westin Boston Waterfront, Boston, MA, 2007;
- 31- E. Hewayde, Investigation on degradation of concrete sewer pipes by sulphuric acid attack, PhD Thesis. **Faculty of Engineering, University of Western Ontario**, 2005;
- 32- Calandra, P. F. - "O desenvolvimento de novas ligas inoxidáveis resistentes à corrosão para as indústrias de processamento", **II o. Simpósio Sul-americano de corrosão metálica**, A.B.C., I.B.P., 175-192, R.J., 1971.
- 33- D. Weng et al, **Surface and Coatings Technology**, 88, 147-156, 1996;
- 34- B Muller et al, **Corrosion Science**, V. 38, No. 7, p.1103-1108, 1996;
- 35- P. R. P. Rodrigues et al, **Anais do International Symposium on Electrochemical methods in Corrosion Research –EMCR97**, Trento – Itália, 25 a 29 de agosto, 1997;

- 36- Paulo R. P. Rodrigues et al, XI SIBEE – **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, P 054, p. 547-550, 05 a 09/ 04/, Maragogi - Alagoas, Brasil, 1999;
- 37- Tseng, Chuan-Ming e Tsai, Wen-Ta, **Materials Chemistry and Physics**, Volume 84, Issue 1, March, p. 162-170, 2004;
- 38- Dagbert, C. ; Meylheuch, J.; Bellon, M. E; Fontaineb, **Electrochimica Acta**, 54, p. 35–40, 2008;
- 39- Ernst, P. , Newman, R. C.; Pit growth studies in stainless steel foils. I. Introduction and pit growth kinetics, **Corrosion Science**, 44 (5), p. 927, 2002;
- 40- Song, F. M. And Sridllar, N. , **Corrosion Science**, Volume 50, p. 70-83, 2008;
- 41- Eric, J.R.; **Electech Research.**, p. 625,1998;
- 42- Lipp, L.; Pletcher, D.; **Electrochim. Acta**, 42, p.1091, 1997.
- 43- Sharma, A. P., Battersby, N. S, and Stewart, D. J.; **rapid method for determining the sensitivity of sulphatereducing bacteria to biocides**, GERBAM — Deuxième Colloque International de Bactériologie marine — CNRS, Brest, 1-5 octobre 1984, IFREMER, Actes de Colloques, 3, pp. 617-619, 1986;
- 44- Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips. Novel mode of microbial energymetabolism: organic-carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54, p. 1472–1480, 1988;
- 45- DAVIS, P.W.; SOLOMON, E.P.; BERG, L.R. *The World of Biology*. Saunders College Publishing, p. 928, 1990.
- 46- BREWIS, T. **Extracción de metales por oxidación bacteriana**. MINING, Abril 1996;
- 47- ESTEBAM, M; DOMIC, M Em: **Hidrometalurgia – Fundamentos, Processos y Aplicaciones**. Cap. 11,Miguel & Mihovilovic. Santiago, 2001;

- 48- Bossolan, N. R. S.; **Introdução à microbiologia**, apostila da disciplina Biologia 3, Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos – São Paulo, Brasil, 2002.
- 49- Fonte pesquisada na rede *internet* em 28/08/2008:  
**[http://www.infoescola.com/imagens/faecimg\\_monera5.gif](http://www.infoescola.com/imagens/faecimg_monera5.gif)**;
- 50- Pelczar, M. J. Jr; Chan, E. C. S. e Krie, N. R., **Microbiologia**, Ed. MacGraw Hill, v.1, p.1072 , 1980;
- 51- Bard, A. J. e FAULKNER, L. R., **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, New York: Wiley, p. 520, 1980;
- 52- Reed, S. J. B., **Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology**, New York: Cambridge University Press, p. 201, 1996;
- 53- Bergey, D. H. and Holt, J. G. - **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 787, 1994.
- 54- Colpaert, H. , **Metalografia dos produtos siderúrgicos comuns**, Ed. Edgard Blucher, 3a edição, 186, (1974);
- 55- Gayosso, M. J. H.; Olivares, G. Z.; C. Juárez Ramirez, N. R. O.; Esquivel, R. G. e Viveros, A. P. - **Electrochimica Acta**, 49, p. 4295–4301, 2004;
- 56- Linhardt, P. - **Electrochimica Acta**, 51, p. 6081–6084, 2006;
- 57- Keresztes, Zs.; Telegdi, J.; Becznerb, J. and Kilmham, E. -**Ektrochimica Acta**, Vol. 43, Nos. 1-2, pp. 77-85, 1998;
- 58- Kuang, F.; Wang, J.; Yan, L. and Zhang, D.- **Electrochimica Acta**, 52 , p. 6084–6088, 2007.
- 59- Keddarn, M., Mattos, O. R. and Takenoutti, H., J. Electrochem. Soc., 128:257, 266, ( 1981).