

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

**ESTUDO DA CORROSÃO MICROBIOLÓGICA NO  
AÇO INOXIDÁVEL 316 EM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**JEFERSON EGNER DE MORAES**

**GUARAPUAVA-PR**

**2009**

**JEFERSON EGNER DE MORAES**

**ESTUDO DA CORROSÃO MICROBIOLÓGICA NO AÇO INOXIDÁVEL 316 EM  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>**

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

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cynthia Beatriz Fürstenberger  
Orientadora

Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues  
Co - orientador

**GUARAPUAVA-PR**

**2009**

Dedico este trabalho a minha esposa

Luciana do Rocio Bahls

Amo você.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Beatriz Fürstenberger, por compartilhar seus conhecimentos, sua amizade, compreensão e apoio a este projeto.

Ao meu co-orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues pela, co-orientação, conhecimento transmitido e apoio na realização deste projeto e amizade.

À Rebeca Caparica, técnica de laboratório do Departamento de Ciências Biológicas, pelo comprometimento e dedicação a esta pesquisa, bem como aos conhecimentos transmitidos.

Ao programa de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Eletroquímica (GPEL), Aline, Douglas, Everson, Maico, Martha, Cristiane e Guilherme, pela ajuda e esclarecimentos durante a realização desse projeto.

## 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> .....	7
2.1- Objetivo Geral.....	7
2.2- Objetivos Específicos.....	7
<b>3- REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	8
3.1 Classificação dos aços inoxidáveis.....	8
3.1.1. Aços inoxidáveis austeníticos.....	8
3.1.1.1 Aço inoxidável AISI 316.....	9
3.1.2 Aços inoxidáveis martensíticos.....	10
3.1.3 Aços inoxidáveis ferríticos.....	11
3.2 Corrosão.....	12
3.2.1 Tipos de corrosão.....	13
3.2.1.1 Corrosão uniforme generalizada.....	14
3.2.1.2 Corrosão localizada.....	15
3.2.1.2.1 Corrosão por pites.....	15
3.2.1.2.2 Corrosão intergranular.....	17
3.2.1.2.3 Corrosão alveolar.....	18
3.2.1.2.4 Corrosão em frestas ou areação diferencial.....	18
3.3 Corrosão microbiológica.....	20
3.3.1 Relação entre corrosão microbiológica e eletroquímica.....	20
3.3.2 Relação entre corrosão microbiológica e aeração diferencial em frestas.....	21
3.3.3 Histórico da corrosão microbiológica.....	24
3.3.4 Biofilme.....	24
3.3.4.1 Composição do biofilme.....	27
3.3.4.2 Etapas de formação do biofilme.....	28
3.3.4.2.1 Formação do “filme condicionador”.....	28
3.3.4.2.2 Adesão inicial dos microorganismos.....	29
3.3.4.2.3 Produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE).....	30
3.3.4.2.4 Maturação do biofilme.....	31
3.3.4.2.5 Desprendimento de porções de biofilme.....	32
3.3.4.3 Conformação estrutural dos biofilmes.....	33
3.3.4.4 Principais fatores que contribuem para a formação do biofilme.....	35
3.3.4.4.1 pH.....	36
3.3.4.4.2 Temperatura.....	36
3.3.4.4.3 Concentração de nutrientes.....	36
3.3.4.4.4 Rugosidade da superfície metálica.....	37
3.4 Bactérias.....	38
3.4.1 Características gerais das bactérias.....	41
3.4.1.1 Parede celular das bactérias.....	43
3.4.1.1.1 Gram-positivas.....	44
3.4.1.1.2 Gram-negativas.....	45
3.4.2 <i>Escherichia coli</i> .....	46
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48

4.1 Soluções empregadas.....	48
4.1.1 Solução pH 6.....	48
4.1.2 Solução pH 7.....	48
4.1.3 Solução pH 8.....	48
4.2 Eletrodos Empregados.....	48
4.2.1 Eletrodo auxiliar de Platina (Pt) ou contra eletrodo.....	48
4.2.2 Eletrodo de referência de sulfato mercurioso (ESM) .....	49
4.2.3 Eletrodo de trabalho aço AISI 316.....	49
4.3 Células eletroquímicas empregadas.....	49
4.3.1 Célula eletroquímica de potencial de circuito aberto.....	49
4.3.2 Célula eletroquímica de potencial de circuito fechado.....	50
4.4 Procedimento experimental.....	51
4.4.1 Preparação do meio de cultura.....	51
4.4.2 Preparação das amostras de aço AISI 316.....	53
4.4.3 Procedimento experimental para caracterização óptica.....	53
4.4.3.1 Procedimento experimental para caracterização em MEV.....	53
4.5 Técnicas Empregadas.....	54
4.5.1 Caracterização eletroquímica.....	54
4.5.1.1 Potencial de circuito aberto (PCA) .....	54
4.5.1.2 Polarização anódica potenciodinâmica (PAP) .....	55
4.5.1.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	56
4.5.1.4 Voltametria cíclica (VC).....	58
4.5.2 Caracterização óptica.....	59
4.5.2.1 Microscopia óptica (MO).....	59
4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	59
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>60</b>
5.1 Potencial de circuito aberto (PCA).....	60
5.2 Polarização anódica potenciodinâmica (PAP).....	62
5.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).. .....	65
5.4 Microscopia óptica (MO).....	67
5.5 Voltametria cíclica (VC).....	75
5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>E</i>	Potencial
<i>E<sub>corr</sub></i>	Potencial de corrosão
<i>j</i>	Densidade de corrente
<i>E<sub>CA</sub></i>	Potencial de circuito aberto
<i>η</i>	Sobretensão
<i>MEV</i>	Microscopia eletrônica de varredura
<i>ESM</i>	Eletrodo de sulfato mercurioso
<i>R<sub>p</sub></i>	Resistência de polarização
<i>AISI</i>	<i>American Iron and Steel Institute</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Tt</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<i>EDX</i>	Energia dispersiva de raios X
<i>ppm</i>	Parte por milhão
<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	Sulfato de sódio
<i>VC</i>	Voltametria cíclica
<i>PAP</i>	Polarização anódica potenciodinâmica
<i>EIE</i>	Espectroscopia de impedância eletroquímica
<i>MO</i>	Microscopia óptica
<i>CE</i>	Contra eletrodo
<i>ER</i>	Eletrodo de referência
<i>EW</i>	Eletrodo de trabalho
<i>EPS</i>	Substância polimérica extracelular
<i>NaOH</i>	Hidróxido de sódio
<i>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	Ácido sulfúrico
<i>E<sub>e</sub></i>	Potencial de equilíbrio
<i>μm</i>	Micrometro
<i>pH</i>	Percentual de Hidrogênio
<i>mV</i>	Milivolts
(EC)	<i>Escherichia coli</i>
v.v.	Velocidade de varredura
<i>Ω</i>	Ohm

Jeferson Egner de Moraes, **Estudo da corrosão microbiológica no aço inoxidável AISI 316 em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>**. Dissertação Mestrado em Química Aplicada, Guarapuava – Paraná, Universidade Estadual do Centro Oeste, 2008.

## RESUMO

O aço AISI 316 é resistente à corrosão, viabilizando sua aplicação em sistemas de distribuição de água, indústrias de papel, petrolífera e alimentícia. Sua durabilidade é devida ao alto teor de cromo e níquel, pois estes elementos formam uma camada de óxido auto-passivante, conferindo-lhe resistência em meios oxidantes.

A durabilidade do aço AISI 316 tem diminuído, devido à ação de microorganismos existentes no meio industrial, onde há a proliferação de algas, fungos e bactérias, que juntos formam o biofilme. No presente trabalho estudou-se a influência da *Escherichia coli* na corrosão do aço AISI 316, em meio de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Foram utilizadas as técnicas de potencial de circuito aberto (PCA), polarização anódica potenciodinâmica (PAP), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), microscopia óptica (MO), voltametria cíclica (VC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos nas curvas de PAP para o pH 7 revelaram que o aço AISI 316 é passivo até 0,95V/ESM. Verificou-se que na região transpassiva a solução com 0,1% de *E. coli* minimizou a densidade de corrente, devido à formação do biofilme porém, quando se aumentou a concentração de *E. coli* para 1% e 10%, notou-se que, a densidade de corrente aumenta significativamente. Isto se deve ao fato de haver o descolamento do biofilme da superfície do metal. Apesar de ter ocorrido um aumento do potencial anódico no meio em pH 6, e em pH 8, as curvas de polarização nos três valores de pH demonstraram comportamentos semelhantes. As EIE confirmaram que a resistência do aço AISI 316 diminui com o aumento da concentração de bactérias. As micrografias para os três valores de pH estudados revelaram a formação de biofilme sobre a superfície do metal, bem como o surgimento de corrosão, comprovada por voltametria cíclica. A MEV elucidou que o tipo de corrosão que o aço inoxidável AISI 316 sofre na presença da *E. coli* é localizada (pites). A região onde o biofilme fica aderido torna-se pouco oxigenada, fazendo com que o aço perca a capacidade de formar a camada de óxido auto-passivante, tornando-se susceptível a corrosão.

**Palavras Chave:** corrosão microbiológica, aço inoxidável AISI 316, *Escherichia coli*



Jeferson Egner de Moraes, **Study of corrosion microbiological of steel AISI 316 in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>** Dissertação Mestrado em Química Aplicada, Guarapuava – Paraná, Universidade Estadual do Centro Oeste, 2008.

## ABSTRACT

Steel AISI 316 is resistant to the corrosion, making possible its application in systems of water distribution, industries of paper, petroliferous and nourishing. Its durability must to the high purport of chromium and nickel; therefore these elements form an auto-passivante oxide layer, conferring resistance to it environmental oxidants. The durability of steel AISI 316 has diminished, due to action of existing microorganisms in environmental industrial, where it has the seaweed increase, fungus and bacterium. In the present work it was studied the influence of *Escherichia coli* in the corrosion of steel AISI 316, in environment Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. The techniques open circuit potential had been used (OCP), Linear Sweep Voltametry (LSV), spectroscopy of electrochemical impedance (SEI), optic microscopy (OM) and cyclic voltametry (CV) and scanning electron microscopy (SEM). The results gotten in the LSV, in pH 7 had disclosed that steel AISI 316 is passive in until 0,95V/ESM. It was verified that in the transpassive region the solution with 0,1% of *E. coli* minimized the current density, two to formation of biofilm, however when the concentration of was increased. *E. coli* for 1% and 10%, this was noticed that the current density increases significantly, if it must to the fact have the to detach of biofilm of the surface of the metal. Although to have occurred a augmentation of the anodic potential in the way in pH 6, and in pH the 8, the linear sweep voltametry in the three values of pH had demonstrated similar behaviors. The SEI had confirmed that the resistance of steel AISI 316 diminishes with the addition of the concentration of bacteria. The micrographs had disclosed the formation of biofilm on the surface of the metal, as well as the sprouting of corrosion, proven for cyclic voltametry. The SEM elucidated that the type of corrosion that stainless steel AISI 316 suffers in the presence from the *E. coli* is located (pitting). The region where biofilm is adhered becomes little oxygenation, making with that the steel loses the capacity to form the auto-passivante oxide layer, becoming susceptible the corrosion.

Words Key: microbiological corrosion, stainless steel AISI 316, *Escherichia coli*

## 1-INTRODUÇÃO

Por todos os lados pode-se observar manifestações dos microorganismos, mesmo nos mais recônditos habitats do planeta Terra é possível encontrá-los, principalmente as bactérias. Estas possuem a indesejável capacidade de colonizar qualquer superfície, desde rochas até implantes médicos nos seres humanos e não existe nenhuma superfície que não possa ser, ou vir a ser colonizada pelas bactérias [1].

Ao longo dos tempos os microorganismos tiveram que desenvolver formas de vida que lhes proporcionassem maior segurança e proteção, para sua permanência nas superfícies colonizadas. Logo se observou que nos ambientes naturais a maioria das bactérias eram encontradas sob a forma de microcolônias aderidas a superfícies sólidas (desenvolvimento *séssil*), e não mais suspensas e dispersas num ambiente aquático (desenvolvimento *planctônico*) [2].

O termo biofilme é usado para descrever a forma de vida *séssil* das bactérias, caracterizado pela adesão destas a suportes sólidos. No interior dos biofilmes as células estão mais protegidas do que se estivessem em suspensão, pois o biofilme atua como uma barreira de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), fazendo com que prevaleça o transporte de nutrientes por difusão através dos poros, canais e áreas de densidade menor, ao invés do transporte por convecção. Assim, as moléculas grandes tem dificuldade de se moverem dentro do biofilme, ao contrário dos nutrientes que são moléculas de tamanho menor e chegam facilmente até as células [4].

Dependendo do ponto de vista, os biofilmes podem ser benéficos ou nocivos, daí a necessidade de estudar este sistema a fim de desenvolver estratégias com o objetivo de melhorar suas características caso seja benéfico, ou para inibir sua ação caso este seja prejudicial. A participação benéfica dos biofilmes pode ser notada em alguns processos ecológicos, principalmente aqueles biofilmes que se formam em ambientes naturais tais como: lagos, leitos dos rios e ambientes marinhos. Estes biofilmes atuam efetivamente na remoção e degradação de contaminantes orgânicos e inorgânicos da água. Por esta razão, este potencial natural dos biofilmes tem sido frequentemente explorado nos processos biotecnológicos, principalmente em biotecnologia ambiental em estações de tratamento de efluentes [5].

Em 1943 se deu o primeiro estudo relacionando à colonização bacteriana de uma superfície sólida a atividades benéficas. Até a década de 70 estudos relacionados ao biofilme

desenvolveram-se lentamente, entretanto, com o surgimento de técnicas microscópicas melhores e efetivas, constatou-se que o modo de vida *séssil* dos microorganismos prevalecia sobre o *planctônico*. Já na década de 80, os estudos relacionados a biofilmes desenvolveram-se mais rápido, tendo seus efeitos benéficos observados não só em tratamento de esgoto, mas também na indústria de fermentação, para produção de vinagre, na indústria farmacêutica e na agricultura [5].

O estudo a respeito de biofilmes requer uma constante busca de conceitos relacionados à Microbiologia, Bioquímica, Química Engenharia e Medicina. Portanto, o biofilme é um assunto de interesse multidisciplinar, cuja potencialidade não oferece somente vantagens ao homem, pois na maioria das situações a adesão de microorganismos a superfícies sólidas é indesejável, uma vez que as bactérias aderidas resultarão inevitavelmente na formação de biofilmes e sua presença em superfícies metálicas pode acelerar processos corrosivos, alterando significativamente o tempo de vida útil de materiais metálicos [5].

As desvantagens relacionadas à formação de biofilmes podem ser as seguintes:

- Nos trocadores de calor dificultam a transferência de calor, implicando na elevação de custos com limpeza e biocidas;
- Em sistemas de membranas causam entupimento e contaminação microbiológica
- O surgimento em cateteres e em implantes médicos, bem como em lentes de contato podem causar infecções graves com conseqüente rejeição de próteses;
- São contaminantes da água potável, por produzirem metabólitos causam odor e sabor desagradável na água, bem como o desprendimento do biofilme pode causar sérios danos à saúde pública uma vez que os microorganismos que o compõem podem ser patogênicos;
- Podem causar problemas relacionados à corrosão.

Os microorganismos podem participar no processo de corrosão de pelo menos três diferentes formas [3]:

- 1) Produzindo substâncias corrosivas originadas em seu crescimento ou metabolismo, sendo que estas substâncias podem ser ácidos orgânicos, ácido sulfúrico, sulfetos e sulfitos.
- 2) Originando pilhas de aeração diferencial por efeito de um consumo desigual de oxigênio em zonas localizadas, este mecanismo de corrosão se dá pela formação de biofilmes na superfície do metal, formando regiões com pouca concentração de oxigênio.
- 3) Diretamente utilizando algum elemento contido na liga metálica que seja essencial para a continuação do metabolismo destes microorganismos [3].

As bactérias participam desse processo de forma ativa, porém sem modificar a natureza eletroquímica da corrosão, pois neste caso também se encontra uma zona anódica onde ocorre a reação de oxidação do metal (corrosão), enquanto que a reação catódica transcorre simultaneamente [3].

A grande capacidade de resistência e adaptação a condições ambientais extremas tais como: temperaturas entre  $-12^{\circ}\text{C}$  e  $110^{\circ}\text{C}$ ; valores de pH entre 0,5 e 13 e pressões entre 0 e 1400 bar, são características que favorecem a presença das bactérias em muitos processos fabris, tais como: papel e celulose, petroquímico, álcool e alimentício. Estes processos industriais têm condições ótimas para o desenvolvimento de bactérias e, além disso, sabe-se que as bactérias não vivem de maneira isolada, estas tendem a se associar formando colônias com outros microorganismos, dando origem ao biofilme [4].

Estima-se que mais de 90% dos microorganismos vivem no planeta Terra sob a forma de biofilme, cuja composição microbiana na sua maioria é de bactérias (98%) e o restante são algas, fungos, protozoários, substâncias poliméricas extracelulares excretadas pelos microorganismos, água e, ainda, partículas sólidas (argila, areia, matéria orgânica e produtos de corrosão) [5].

O biofilme tem como principais finalidades:

- Proteger os microorganismos das ações exteriores, tais como: ataques químicos, físicos e mecânicos;
- Proporcionar suporte físico e aderência às superfícies colonizadas;
- Auxiliar na captura e transporte de nutrientes por difusão;
- Desenvolver microconsórcios, estabelecendo uma relação de simbiose;
- Estabelecer e colonizar nichos ecológicos.

Na indústria, a acumulação de biofilmes pode acelerar a deterioração dos materiais metálicos, resultando em sérios prejuízos associados à corrosão de natureza microbiológica.

Vários são tipos de corrosão existentes no âmbito industrial, sendo os mais comuns : corrosão generalizada, galvânica, frestas, puntiforme (pite), intergranular, intragranular, seletiva, erosão, corrente de fuga e sob tensão. Com exceção dos metais nobres a maioria dos metais em contato com atmosfera forma um sistema termodinamicamente instável, logo estes reagirão com elementos presentes no ar e no meio industrial resultando na formação de óxidos, hidróxidos e outros compostos semelhantes [6].

Portanto, a deterioração dos metais pela ação do meio circundante em que estes são expostos acarreta em um grande interesse prático, pois se sabe que a corrosão causa prejuízos estimados de 1,5 a 3,5% do PIB dos países industrializados. Daí a necessidade de se investigar a propriedade de alguns metais a fim de desenvolver ligas resistentes aos ambientes industriais nos quais estes são aplicados. Apesar de a termodinâmica indicar uma reação química cujo produto (óxidos, ou hidróxidos metálicos) é energeticamente mais estável, esta não se refere à velocidade com que a reação de oxidação dos metais procede. É devido a este fato que a aplicabilidade dos metais no âmbito industrial se faz vantajosa. Além do mais, o desenvolvimento de ligas de aço (ferríticos, martensíticos e austeníticos) tornam a velocidade de deterioração dos metais relativamente baixa [6].

As ligas austenita, ferrítica e martensítica são à base de Fe, Ni ou Co, contendo Cr para resistência à oxidação e outros elementos para resistência mecânica a temperatura elevada e são tradicionalmente utilizadas em processos fabris agressivos, pois se sabe que a corrosão dos metais está intimamente ligada à ação do meio. Além das condições de temperatura, pressão e pH influenciarem na cinética de corrosão do ferro e suas ligas, a presença de microorganismos é um fator a mais que acelera a deterioração dos materiais metálicos, no qual o processo de corrosão decorrente da atividade vital de microorganismos é denominado por alguns autores de biocorrosão, corrosão microbiologicamente influenciada ou simplesmente de corrosão microbiológica [7].

Os primeiros registros de corrosão microbiológica causada pela formação de biofilmes foram publicados em 1891. Desde então a corrosão influenciada por microorganismos vem sendo estudada e considerada como um dos grandes problemas que atingem vários setores da indústria química, petrolífera, civil, naval, alimentícia, automobilística, aeronáutica, de papel, dentre outras, por causa das graves conseqüências de ordem econômica e ambiental [24].

Observaram que microorganismos aderidos às superfícies metálicas aceleravam o processo de corrosão dos materiais metálicos, originando aos tipos de corrosão comumente encontrados a aeração diferencial, alveolar, seletiva, puntiforme e generalizada. Uma estimativa feita em 1996 revelou que os gastos gerais devido à corrosão microbiológica foram aproximadamente 30 a 50 bilhões de dólares anuais, sendo que tais custos levaram as indústrias a tomar uma série de medidas objetivando inibir a corrosão microbiológica [24].

Dentre os microorganismos relacionados com a corrosão microbiológica, de longe destacam-se as bactérias, pois são as principais responsáveis pela produção das substância poliméricas extracelulares (SPE) que dão suporte e aderência à colônia sobre a superfície metálica e ainda são microorganismos que se adaptam facilmente nos mais variados ambientes [24].

Entre as bactérias associadas à corrosão microbiológica nas redutoras de sulfatos destacam-se os gêneros *Desulfovibrio* e o *Desulfotomaculum*. Ainda que todos os microorganismos redutores de sulfato requeiram uma fonte orgânica de carbono estes podem reduzir o sulfato a sulfeto [3].

Há também bactérias oxidantes de ferro, que conseguem obter energia necessária para seus processos vitais oxidando o íon ferroso a férrico. As *Ferrobacillus ferrooxidans* estão relacionadas a sérios casos de corrosão em instalações minerais, devido ao ácido sulfúrico

produzido a partir de compostos de enxofre que são oxidados pelo íon férrico gerado pelo microorganismo [3].

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são encontradas juntamente com fungos do gênero *Cladosporium* e, em conjunto com as bactérias redutoras de sulfato, formam uma perfeita simbiose no interior de tanques de combustíveis de aviões, responsáveis diretamente pela corrosão de ligas de alumínio.

Os biofilmes são estruturas complexas formados por diferentes tipos de microorganismos porém, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*, vêm sendo intensamente estudadas como modelos na formação de biofilmes de espécies únicas com participação direta ou indireta na corrosão de materiais aplicados na indústria (ligas de aço, ligas de alumínio e PVC) [7].

Neste trabalho estudou-se a influência da *Escherichia coli* na corrosão do aço austenítico AISI 316, cuja aplicação está nas tubulações de saneamento básico, trocadores de calor em destilarias de indústrias petrolíferas, bem como nas estruturas de máquinas de fabricação de papel.

O interesse em estudar a influência desta bactéria na corrosão do aço AISI 316 está relacionado à facilidade de encontrar a *E. coli* em diversos tipos de ambientes. Isto se deve ao fato de que a *E. coli* é capaz de colonizar em determinadas condições ambientais, como meios mínimos suplementados com aminoácidos [36].

Nas indústrias há condições ótimas para o desenvolvimento da *E. coli*, porém o meio encontrado em estações de tratamento d'água e saneamento básico é ainda maior, pois a *E. coli* tem mais facilidade de formar colônias em ambientes com pH próximo da neutralidade e em temperaturas na faixa de 33°C e 38°C [8].

É comum encontrar formações de biofilmes com presença de *E. coli* nas tubulações de aço AISI 316 das estações de saneamento. Daí tem-se que a durabilidade do aço AISI 316 diminui, devido à ação destes microorganismos que direta ou indiretamente promovem a degradação desta liga, acarretando prejuízos relacionados à corrosão microbiológica por *E. coli* existentes neste setor [8].

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Estudar a influência de *Escherichia coli* na corrosão do aço inoxidável AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar eletroquimicamente a ação de *Escherichia coli* na corrosão do aço inoxidável AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em três diferentes pH: (6, 7 e 8);
- 2) Caracterizar o tipo de corrosão do aço inoxidável AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  contendo *Escherichia coli*.



### 3- REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Classificações dos aços inoxidáveis

Os aços inoxidáveis são classificados de acordo com sua estrutura cristalina predominante, sendo assim estes podem ser divididos em dois grandes grupos [45]:

Série 300 (austeníticos não magnéticos)

Série 400 (martensíticos não magnéticos e ferríticos magnéticos)

##### 3.1.1 Aços inoxidáveis austeníticos

É a chamada série 300 que são ligas de Fe + Cr + Ni que não endurecem por tratamento térmico de têmpera, incluem-se nesta família: (AISI) 301, 302, 304, 304L, 308, 316, 316L, 321, 347. Apresentam boa resistência à corrosão em diversos meios, excelente tenacidade, mesmo em baixas temperaturas e boa resistência mecânica a temperatura elevada [9].

Sabendo-se que os aços inoxidáveis não são totalmente inoxidáveis, faz-se necessário buscar meios alternativos com o objetivo de se evitar a corrosão destes. VIOMAR et al, 2008 [48] fizeram um estudo do comportamento eletroquímico da cisteína e do difosfonato e de ambos misturados a fim de testar a ação inibidora destes frente à corrosão do aço inoxidável 304 em meio de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, empregando-se as técnicas de potencial de circuito aberto, polarização anódica potencioestática, espectroscopia de impedância eletroquímica, cronoamperometria e microscopia óptica. Com os resultados obtidos verificou-se, que no potencial de circuito aberto a cisteína apresentou efeito inibidor e catalisador em função do tempo de imersão da amostra metálica na solução eletrolítica. A polarização anódica potencioestática mostrou que a mistura da cisteína com o difosfonato inibem a corrosão do aço 304, e isto confirmou-se nas micrografias e espectroscopias de impedância eletroquímica.

MELATO et al 2006 [11] estudaram o comportamento dos aços inox AISI 301, 310 e 316 em soluções fortemente alcalinas. A análise dos resultados obtidos desde o potencial de circuito aberto até a região de liberação de oxigênio permitiu verificar a corrosão destas ligas

no intervalo de -0,2 a -0,05 V vs ECS, seguida da formação de uma camada de óxido que não passivava com eficácia a superfície destas amostras de aço. Por mais que haja a formação de filmes de óxidos passivantes por meio dos próprios elementos contidos na liga geralmente óxidos de cromo, estes não garantiram a completa passivação da superfície metálica. Por mais que os aços austeníticos sejam nomeadamente chamados de aços inoxidáveis por formarem uma camada protetora de óxido de cromo, os resultados evidenciaram a necessidade de buscar caminhos alternativos de modo prolongue a durabilidade destas ligas em meios agressivos.

A Tabela 1 mostra os principais aços desta família e suas aplicações [9].

**Tabela 1:** Principais aços inoxidáveis austeníticos e suas aplicações

<b>Aço</b>	<b>%C</b>	<b>%Cr</b>	<b>%Ni</b>	<b>%Mo</b>	<b>Aplicações específicas</b>
AISI303	0,15 máx.	18	9	0,6máx.	Peças torneadas (parafusos, pinos, porcas etc.) para indústria alimentícia e automobilística.
AISI304	0,08 máx	19	10	–	Tubulações, trocadores de calor, para indústrias química, petroquímica, farmacêuticas alimentícias e de celulose.
AISI304L	0,03 máx.	19	10	–	Indústrias aeronáuticas e elétricas
AISI316	0,08 máx	17	12	2,5	Mesmas aplicações do aço 304, mas possui melhor resistência a corrosão, é amplamente empregado nas indústrias de papel.
AISI316L	0,03máx.	17	12	2,5	Mesmas aplicações do aço 316, para partes soldadas.

### 3.1.1.1 Aço inoxidável AISI 316

O aço austenítico AISI 316 é uma liga caracterizada pelos elevados teores de cromo e níquel, que aumentam a resistência deste aço à corrosão, pois estes dois elementos atuam formando uma camada de óxido auto-passivante tornando-o resistente em ambientes oxidantes. Esta liga é utilizada nos mais diversos segmentos da indústria, em ambientes que exigem resistência a altas temperaturas ou condições criogênicas. A composição química do aço AISI 316 é mostrada na tabela 2 [11].

**Tabela 2:** Composição química em % m/m do aço AISI 316

<b>Elemento</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Mo</b>	<b>Mn</b>	<b>Si</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>C</b>
<b>% m/m</b>	17,0	12,0	2,5	2,0	0,75	0,04	0,03	0,10	0,08

O estudo da durabilidade desta liga frente aos vários processos fabris, nos quais este é aplicado, tem grande importância econômica, pois evitar prejuízos atrai o interesse de diversos setores industriais que vem sendo confrontados com a corrosão desta liga.

COSTA et al 2008 [22] avaliaram o efeito da rugosidade superficial na corrosão por pites do aço AISI 316 empregando-se as técnicas eletroquímicas de polarização anódica potenciodinâmica e perfilometria tridimensional. Três amostras de aço tiveram acabamentos superficiais diferentes. A partir de uma amostra com lixa de 600 mesh, outra com 1200 mesh e a terceira com 1 $\mu$ m, fez-se a polarização anódica potenciodinâmica em uma solução aquosa de NaCl 3,5% (p/v) a uma temperatura de 30° C. Logo após estes ensaios, fez-se micrografia das amostras e as imagens topográficas da superfície, para se obter o volume dos pites. Observaram a partir dos ensaios eletroquímicos e de perfilometria que as superfícies mais rugosas apresentaram menores potenciais de pite e isto acarretou em um maior volume de pites produzido na superfície do metal. As imagens topográficas mostraram que a amostra de aço lixada com 600 mesh teve um volume de pite 4 vezes maior que a amostra lixada com 1200 mesh e 14 vezes maior que a amostra polida com 1  $\mu$ m. Portanto, os resultados apontaram que acabamentos superficiais mais grosseiros apresentam menor potencial de pite, bem como maior susceptibilidade a este tipo de corrosão.

### 3.1.2. Aços inoxidáveis martensíticos

São ligas de Fe + Cr, sendo endurecidas por tratamento térmico de têmpera. Incluem-se nesta família os aços: (AISI) 403, 410, 414, 416, 420, 431, 440A, B e C, 501. Em função da adição de cromo, tem resistência satisfatória a corrosão em diversos meios. A Tabela 3 apresenta os principais aços desta família e suas aplicações [9].

**Tabela 3:** Principais aços inoxidáveis martensíticos e suas aplicações.

Aço	% C	%Cr	% Ni	%Mo	Aplicações típicas
AISI 410	0,1	12,5	–	–	Palhetas para turbinas a vapor, eixos e rotores.
AISI420	0,2	13	–	–	Instrumentos cirúrgicos e dentários e instrumentos de medição.
AISI440C	1,1	17,5	0,75máx.	0,75máx	Rolamentos, rolos para conformação de embalagens, ex: latas de cerveja.

### 3.1.3 Aços inoxidáveis ferríticos

São ligas de Fe + Cr essencialmente ferríticas, com alto teor de cromo e baixo carbono e não endurecem por tratamento térmico de têmpera. Os principais tipos são: (AISI) 405, 430, 430 F, 444, 446, 502. Na aplicação destes aços deve ser levada em consideração a resistência ao impacto, relativamente baixa, e os problemas associados a sua soldabilidade. A Tabela 4 mostra o principal aço desta família e suas aplicações [9].

**Tabela 4:** Principal aço inoxidável ferrítico e suas aplicações

Aço	%C	%Cr	Aplicações típicas
AISI 430	0,1máx.	16,5	Peças para queimadores de óleo, equipamentos para refinaria, pias p/ cozinha, sopradores de fuligem, tanques para transporte de combustíveis

Apesar do aço inoxidável 430 ter em sua composição teores de cromo acima de 16%, esta liga não está imune à corrosão microbiológica. ANUNZIATO et al 2008 [46] estudaram o comportamento eletroquímico de microorganismos na oxidação do aço 430, com o objetivo de investigar a resistência deste, em meio de  $H_2SO_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença da bactéria *Thiobacillus thiooxidans* (Tt). Empregaram técnicas de medidas gravimétricas, polarização anódica potencioestática, potenciodinâmica cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica, microscopias óptica e eletrônica de varredura. Os resultados obtidos mostraram que ao imergir o aço por um período de 180 minutos em meio contendo a bactéria (Tt) há a formação de biofilme que inicialmente bloqueia a oxidação do metal. Já as curvas de polarização anódica potencioestática mostraram que a presença da bactéria no meio catalisa a oxidação do aço 430, e o mesmo foi observado na espectroscopia de impedância eletroquímica. A aplicação da polarização cíclica na região passiva do aço inibiu a formação do biofilme na superfície do aço 430 e a comprovação veio com a microscopia eletrônica de varredura.

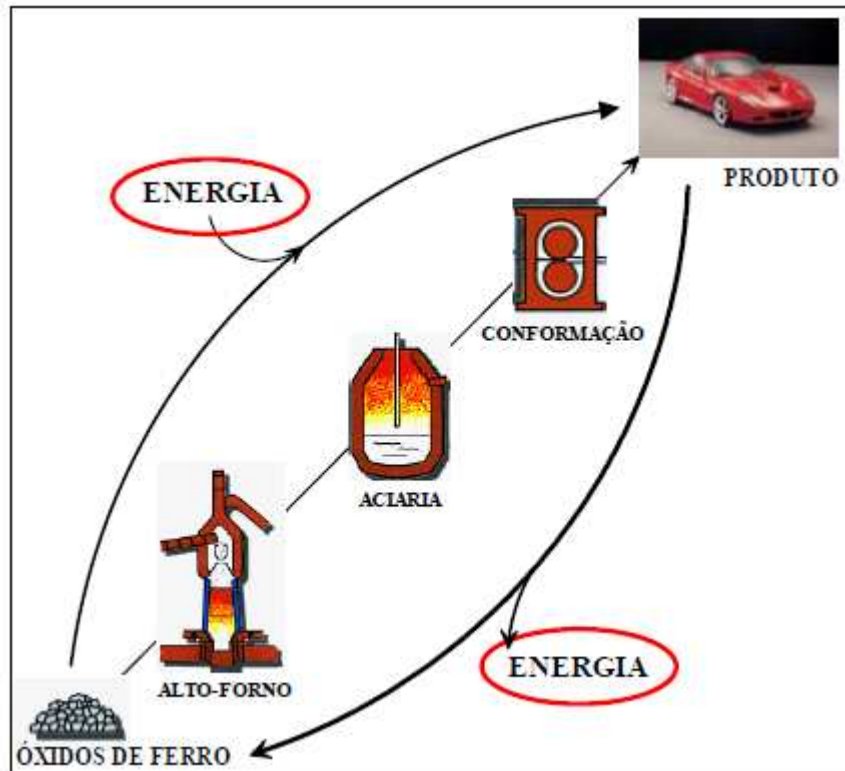
Outro aço ferrítico que teve sua resistência estudada frente à ação de microorganismos foi o aço AISI 444, onde MACHADO et al 2005 [19] avaliaram a corrosão microbiológica deste aço por microorganismos presentes em amostras de petróleo. Foram analisadas amostras de petróleo do Brasil e Venezuela e conseqüentemente emulsificaram estas amostras com Tween 20 esterilizado. A partir desta emulsão foram tiradas alíquotas de 1 mL e estas foram inoculadas em 30 mL de um meio mineral sintético acrescido de 0,1% de extrato de levedura.

MACHADO et al 2005 [19] mantiveram estes meios sob agitação de 160 rpm, a temperatura ambiente para promover o crescimento microbiano de prováveis microorganismos presentes nas amostras de petróleo. Os frascos foram analisados periodicamente a fim de detectar o crescimento microbiano. A partir do décimo dia de cultivo “semeou-se” amostras destas culturas em placas de Petri contendo agar nutritivo e agar Sabouraud com o objetivo de isolar bactérias e fungos. Os microorganismos isolados foram submetidos à caracterização morfológica e cultural, bem como o potencial a oxidar o aço 444. Com esta finalidade, amostras de aço 444 com dimensões de 2 cm x 1cm foram imersas em 30 mL das amostras de petróleo e incubadas a temperatura ambiente por 30 dias. Após este período as amostras de aço foram retiradas e analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de energia dispersiva de raios X (EDX) para verificação de biofilme e possível corrosão pela ação de microorganismos. Os resultados mostraram que a amostra de petróleo do Brasil estava contaminada apenas por um tipo de bactéria a do gênero *Staphylococcus*. Já, a amostra de petróleo da Venezuela apresentou uma flora microbiana mais diversificada com pelo menos dois tipos de bactérias Gram positivas na forma de bastonetes e um fungo Ascomiceto. Pela MEV foi possível identificar pites de corrosão nas amostras de aço que foram imersas em petróleo venezuelano. Os microorganismos presentes nas amostras potencializaram a corrosão, que confirmou-se por meio dos picos de oxigênio caracterizados no EDX obtidos neste trabalho.

### **3.2 Corrosão**

Define-se a corrosão como a destruição de materiais metálicos sob a ação química ou eletroquímica do meio circunvizinho [10].

Comumente no processo de corrosão, os metais reagem com elementos não metálicos presentes no meio, geralmente oxigênio e enxofre, resultando em compostos semelhantes aos encontrados na natureza, dos quais foram extraídos, portanto a corrosão é um processo espontâneo ( $\Delta G < 0$ ) e corresponde ao inverso do processo da metalurgia, conforme ilustra a Figura 1 [21].



**Figura 1:** Ciclo dos metais

Fonte: <[http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/controla\\_da\\_corrosao\\_eetapa\\_de\\_pr](http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/controla_da_corrosao_eetapa_de_pr)>

Com exceção do ouro, platina, prata, mercúrio e cobre todos os outros metais existem na natureza no estado combinado na forma de minério que é a forma termodinamicamente mais estável. Para transformar o minério em metal é necessário fornecer-lhe uma grande quantidade de energia, que geralmente é na forma de calor, sendo que esta energia é armazenada no metal e é perdida ou liberada quando este é corroído [6].

### 3.2.1 Tipos de corrosão

Os tipos de corrosões podem ser classificados de forma geral como generalizadas (também chamada de corrosão uniforme) ou localizadas [12, 13].

### 3.2.1.1 Corrosão uniforme generalizada

Consiste em uma reação química ou eletroquímica que procede uniformemente sobre toda a superfície do metal. Conseqüentemente o metal perde espessura podendo até romper-se [12].

Quando o ataque é uniforme a taxa de corrosão pode ser medida através das unidades **mdd** ou **mpy** [16].

Estas taxas **mdd** e **mpy** expressam a velocidade de corrosão de um material metálico e são importantes para determinar o tempo de vida útil destes materiais. Geralmente, os valores das taxas de corrosão são expressos em:

- Redução da espessura do material por unidade de tempo em mm/ano;
- Perda de massa por unidade de área, por unidade de tempo mg/dm<sup>2</sup>/dia (**mdd**) ou milésimos de polegada por ano (**mpy**).

Para calcular a taxa de corrosão pode-se usar a seguinte equação:

**Equação 1:** 
$$V_{corr} = \frac{\Delta m}{A.t}$$

Onde:

**V<sub>corr</sub>** = velocidade de corrosão (g cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>);

**Δm** = variação da massa (m<sub>i</sub> - m<sub>f</sub>);

**A** = área média da placa de aço em cm<sup>2</sup>;

**t** = tempo de imersão da placa em minutos (min.)

A Figura 2, mostra um exemplo típico de corrosão uniforme generalizada.



**Figura 2:** Corrosão uniforme generalizada

Fonte: <[http:// www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão.pdf](http://www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão.pdf)>.

### **3.2.1.2 Corrosão localizada**

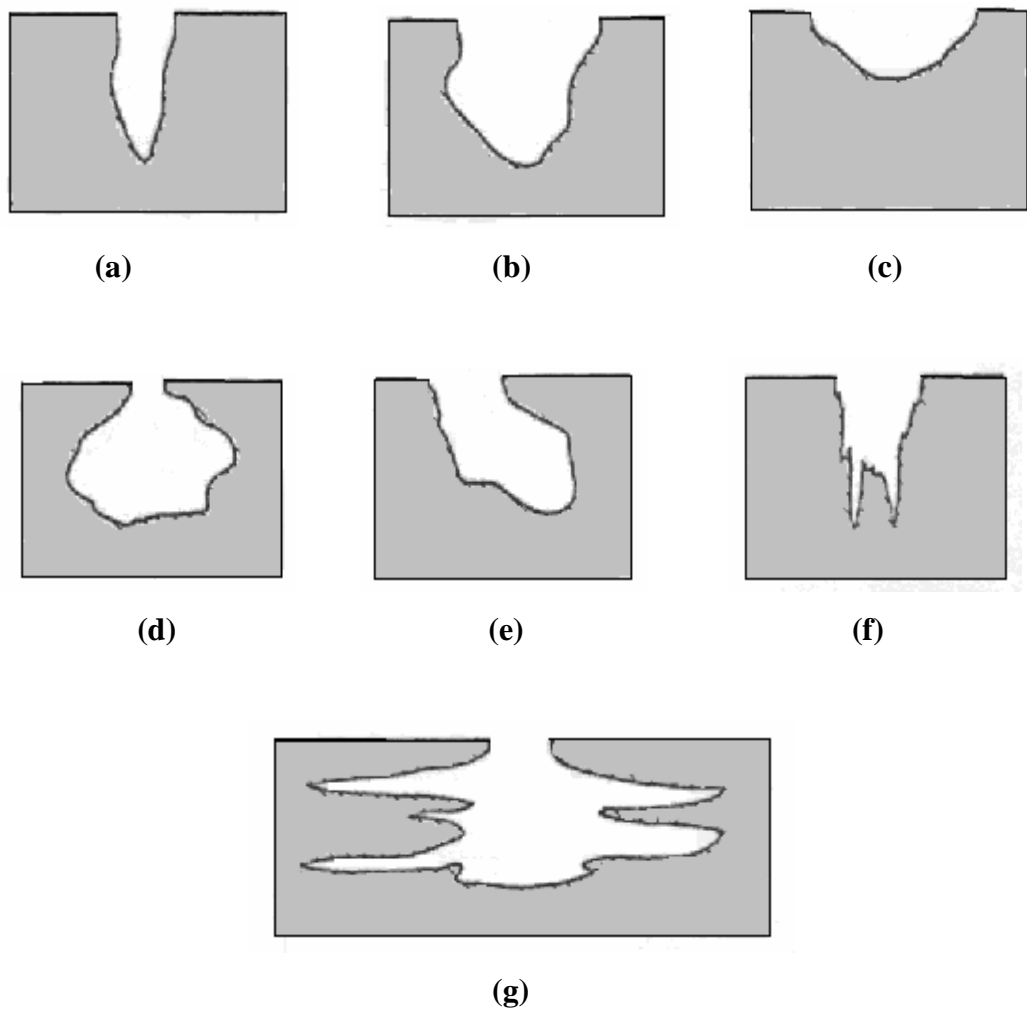
Este tipo de corrosão ocorre em determinados pontos da superfície metálica, em ligas, cuja heterogeneidade é grande. Dentre os mais variados mecanismos de corrosão localizada, no presente trabalho serão destacados os tipos mais comumente encontrados [12, 13].

#### **3.2.1.2.1 Corrosão por pites**

É uma forma de corrosão muito localizada, resultado do ataque intenso em áreas de ordem de  $\text{mm}^2$  cujo restante da superfície metálica permanece sem sofrer corrosão. Os pites de corrosão propagam-se para o interior do metal podendo até transpassá-lo [23].

As formas como um pite pode se apresentar, são variadas conforme estão ilustradas na Figura 3 [6].

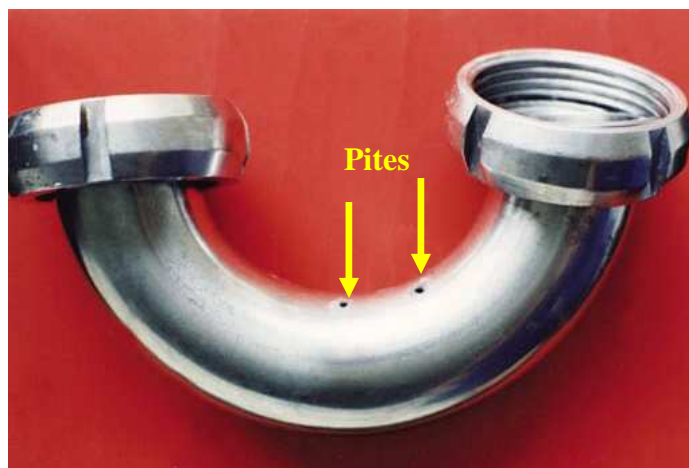




**Figura 3:** Variações nas formas de seções transversais de pites, **(a):** estreito profundo, **(b):** elíptica, **(c):** largo superficial, **(d):** subsuperfície, **(e):** subelíptica, **(f):** vertical, **(g):** horizontal.

Fonte: <[http:// www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão .pdf](http://www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão.pdf)>

Inicialmente, a extensão dos pites é superficial e a redução de um componente é considerada desprezível porém, em alguns exemplos, a profundidade da corrosão perfurou o material metálico. A Figura 4 mostra uma tubulação de aço inoxidável perfurada [6].

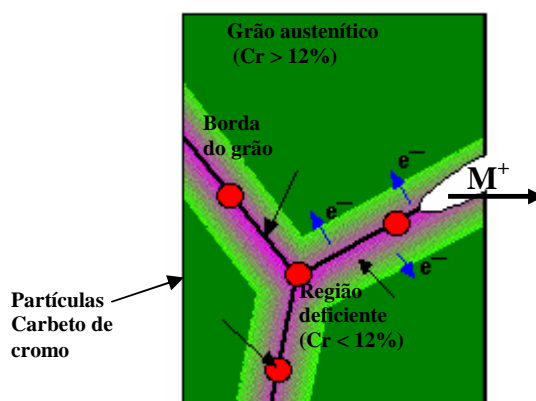


**Figura 4:** Corrosão por pite em aço inoxidável

Fonte: <<http://www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão.pdf>>

### 3.2.1.2.2 Corrosão intergranular

A teoria mais aceita para este tipo de corrosão está baseada no empobrecimento de cromo nas áreas adjacentes ao contorno de grão, devido à precipitação de carbeto do cromo. A corrosão ocorre entre os grãos da estrutura cristalina do material metálico, conforme ilustra a Figura 5 [6].



**Figura 5:** corrosão intergranular

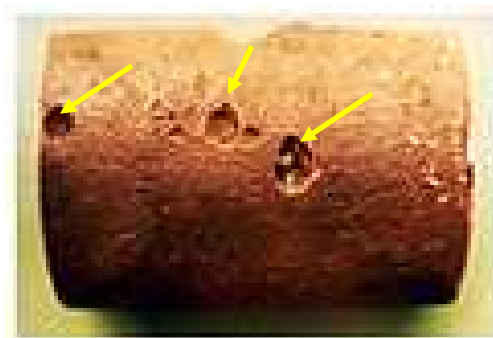
Fonte: <[www.em.pucrs.br/~eleani/Protegidos/12-%20corrosao\\_degradação.ppt](http://www.em.pucrs.br/~eleani/Protegidos/12-%20corrosao_degradação.ppt)>

As áreas da liga com menor concentração de cromo no contorno do grão tornam-se menos resistente à corrosão, pois uma liga cuja concentração de cromo está abaixo de 12% tem a formação da camada passivante de óxido de cromo comprometida, formam-se então,

pilhas entre o contorno do grão (zona anódica) e o centro do grão (zona catódica). Logo, a área anódica é muito menor que a área catódica ( $A_{\text{anódica}} \ll A_{\text{catódica}}$ ) dando origem ao processo de corrosão localizada entre os grãos [6].

### 3.2.1.2.3 Corrosão alveolar

Este tipo de corrosão se inicia a partir da dissolução de inclusões do metal, de frestas ou ainda de incrustações (depósitos de material diferente do metal ex: sílica,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ) originando sulcos no metal que lembram alvéolos. Este tipo de corrosão apresenta fundo arredondado e profundidade menor que seu diâmetro. Tal característica é apresentada na Figura 6 [6].



**Figura 6:** Corrosão alveolar

Fonte: <<http://www.ufpr.br/arquivos/lea/material%20corrosão.pdf>>

### 3.2.1.2.4 Corrosão em frestas ou areação diferencial

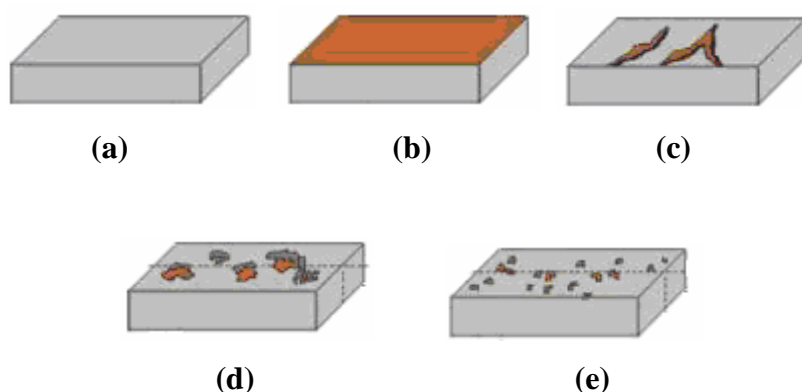
Este tipo de corrosão apresenta-se de forma localizada em junções de duas peças de aço, formando uma pilha por aeração diferencial, onde a concentração de oxigênio no interior da fresta é menor (ânodo), e a concentração de oxigênio do meio circundante é maior (cátodo). Além disso, depósitos de materiais não metálicos tais como: areia, produtos de corrosão e íons de eletrólitos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Na}^+$  etc.) presentes no meio aceleram ainda mais este processo de corrosão. A Figura 7 mostra algumas situações onde possivelmente ocorra a corrosão em frestas [21].



**Figura 7:** Corrosão por aeração diferencial em frestas

Fonte: <[http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/control\\_e\\_da\\_corrosao\\_eetapa\\_de\\_pr](http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/control_e_da_corrosao_eetapa_de_pr)>

A Figura 8 mostra um desenho esquemático dos tipos de corrosão citados anteriormente [16].



**Figura 8:** Tipos de corrosão. (a): metal sem corrosão, (b): corrosão generalizada uniforme, (c): corrosão intergranular, (d): corrosão alveolar, (e): corrosão puntiforme (pite).

Fonte: <[http://www.iop.com.br/3i\\_corrosao\\_2html](http://www.iop.com.br/3i_corrosao_2html)>

Vale ressaltar que são relatados nesta dissertação alguns dos muitos tipos de corrosão encontradas no dia a dia porém, o objetivo deste trabalho já especificado anteriormente é estudar a corrosão induzida pela bactéria *Escherichia coli* (corrosão microbiológica) frente ao aço AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

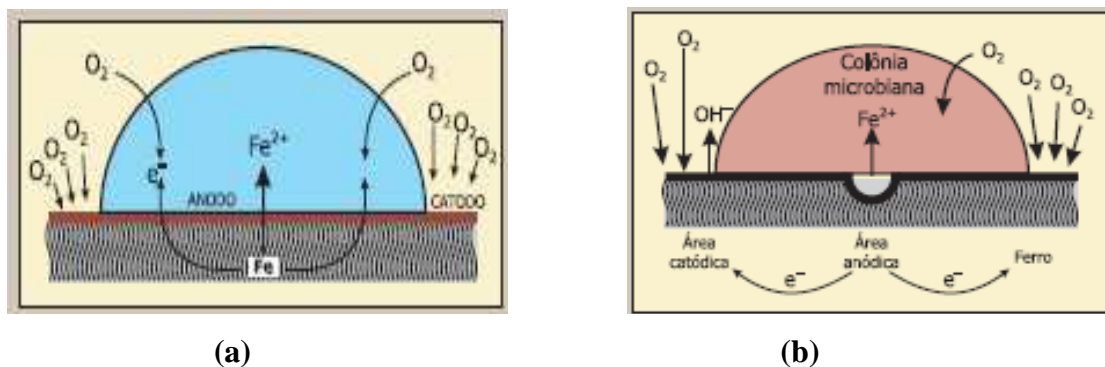
### **3.3 Corrosão microbiológica**

Define-se corrosão microbiológica como o processo de deterioração de um metal provocado pela atividade biológica de microorganismos vivos. A adesão de microorganismos em superfícies metálicas pode induzir, catalisar ou manter a reação de oxidação na interface metal/microorganismo/solução, conforme os seguintes mecanismos:

- Aceleração de uma corrosão localizada devido à formação de regiões com diferentes concentrações de oxigênio;
- Influência direta na velocidade das reações anódicas e catódicas;
- Modificação na resistência de películas passivantes existentes nas superfícies metálicas pelos produtos do metabolismo microbiano;
- Geração de meios corrosivos produzindo substâncias agressivas tais como ácidos orgânicos e inorgânicos [20].

#### **3.3.1 Relação entre corrosão microbiológica e eletroquímica**

Na corrosão microbiológica a natureza eletroquímica da corrosão permanece pois, neste caso, também há regiões anódicas, onde ocorre a oxidação do metal (corrosão), bem como regiões catódicas transcorrendo simultaneamente. Na Figura 9 são ilustrados os dois mecanismos de corrosão [3].



**Figura 9:** (a) corrosão inorgânica, uma gota de água sobre o aço; (b) colônia microbiana sobre o aço, o mecanismo é semelhante ao da Figura (a).

Fonte: <<http://www.recuperar.com.br/revistas/meuproblema80>>

Na representação esquemática da Figura 9 (a), podem-se observar regiões anódicas e catódicas, bem como um gradiente de concentração de oxigênio entre ambas originando uma pilha de corrosão por aeração diferencial. Tal semelhança também é observada no esquema ilustrado na Figura 9 (b). A colônia microbiana que se adere à superfície do aço forma regiões pouco oxigenadas (ânodo), fazendo com que transcorra o mecanismo eletroquímico de corrosão por aeração diferencial [3].

### 3.3.2 Relação entre corrosão microbiológica e aeração diferencial em frestas

O mecanismo de corrosão em frestas procede de acordo com as seguintes etapas:

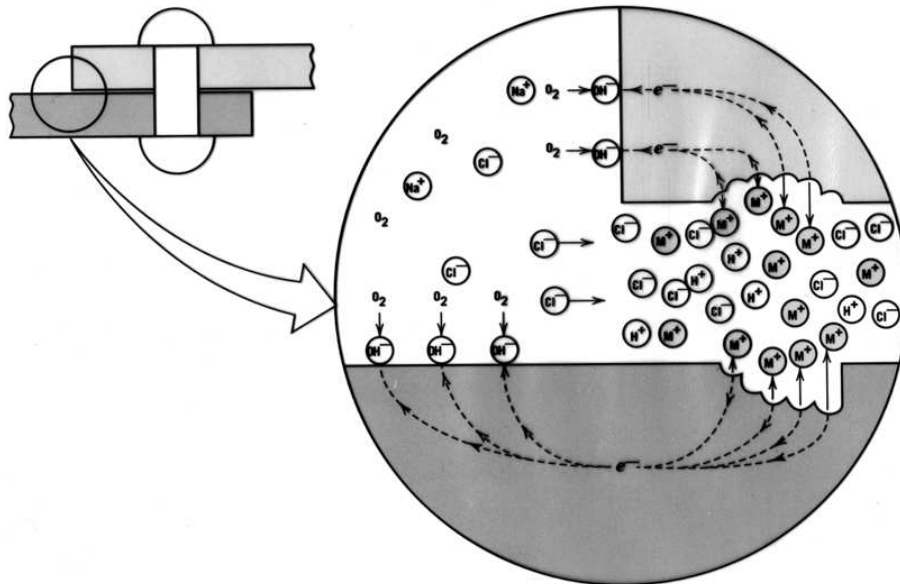
- 1) Início de uma corrosão generalizada;
- 2) Diminuição da concentração de  $O_2$  no interior da fresta, induzindo a formação da pilha por aeração diferencial;
- 3) Aumento da concentração de cátions metálicos na fresta, por consequência da corrosão já existente;
- 4) Difusão de ânions ( $Cl^-$ ) para o interior da fresta devido ao aumento da concentração de cátions metálicos;

5) Dentre os ânions agressivos, o íon cloreto é um dos que apresenta maior coeficiente de difusão combinando-se com íons metálicos;

6) Cloretos metálicos reagem com a água formando hidróxidos e ácido clorídrico que catalisa o processo de corrosão conforme segue a reação:



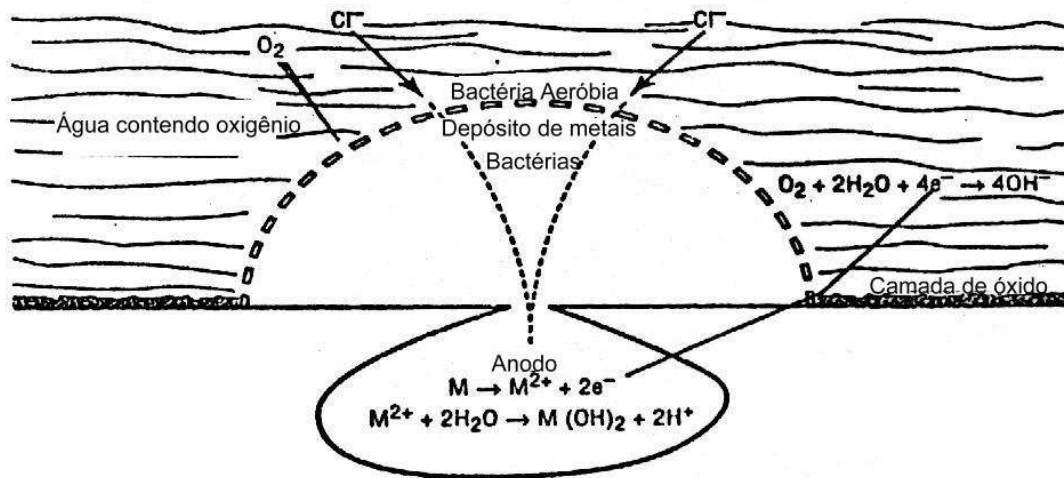
Na Figura 10 está ilustrado o mecanismo da corrosão em frestas.



**Figura 10:** Mecanismo de corrosão em frestas

Fonte: CALLISTER. Materials science and Engineering na introduction 3 ed. 1993

A Figura 11 ilustra o mecanismo da corrosão por aeração diferencial induzida por microorganismos [15].



**Figura 11:** Diagrama esquemático da formação de pilhas de aeração diferencial.

Fonte: LITTLE, B.; WAGNER, P. Myths related to microbiologically influenced corrosion. Material Performance. 1997.

O mecanismo de aeração diferencial induzido pela adesão de bactérias sobre a superfície do aço pode ser descrito nas seguintes etapas:

- 1) Formação da célula de aeração diferencial devido à adesão dos microorganismos do biofilme e a deposição dos produtos de corrosão;
- 2) Abaixo do biofilme o metal tem pouco oxigênio originando a região anódica da pilha, bem como a região externa do biofilme rica em oxigênio forma o cátodo da pilha;
- 3) Difusão de ânions ( $Cl^-$ ) para o interior ao ânodo a fim de neutralizar cargas devido ao aumento da concentração de cátions metálicos formando cloretos de metais pesados;
- 4) Reações de hidrólise ocorrem simultaneamente devido à oxidação do metal e formação de cloretos metálicos, agravando o processo de corrosão de acordo com as seguintes reações [15]:





### 3.3.3 Histórico da corrosão microbiológica

No século XX Garret foi quem mencionou pela primeira vez um processo de corrosão induzido por microorganismos, referindo-se a corrosão de chumbo por amoníaco, nitritos e nitratos produzidos por bactérias aderidas a esta superfície [3].

Em 1934, publicou-se o trabalho de Von W. Kühn e Van Der Vlugt, que apresentou casos de corrosão em ausência de oxigênio devido à ação de bactérias redutoras. Em 1954 nos Estados Unidos a corrosão microbiológica em encanamentos subterrâneos causou um prejuízo em torno de 500 milhões a 2 bilhões de dólares. No mesmo período, no Japão as perdas relacionadas à corrosão microbiológica foram em torno de 200 mil de dólares [3].

### 3.3.4 Biofilme

O primeiro passo para que ocorra a corrosão microbiológica é a formação do biofilme. O termo biofilme descreve a forma de vida *séssil*, que caracteriza-se pela adesão de bactérias a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) [23].

A definição mais usual de biofilme é a de uma matriz polimérica gelatinosa constituída por microorganismos, sendo 98% bactérias e o restante são fungos, microalgas e protozoários. O biofilme tem a função de imobilizar nutrientes, proteger as células microbianas e dar suporte à superfície colonizada [24].

As células sob um biofilme são de quinhentas a mil vezes mais resistentes do que as células no estado *planctônico*, pois a barreira física que este forma sobre as células impede

que agentes bactericidas cheguem aos sítios ativos das células. Além disso, o biofilme protege contra radiações UV, variações de pH e dessecação [53].

TORRES 2001 [47] estudou a cinética de parâmetros microbiológicos na formação de biofilmes, usando amostras de aço carbono AISI 1020 com área média de aproximadamente  $7,5 \text{ cm}^2$ . Para determinar a cinética de formação de um biofilme utilizou-se de um meio aquoso turbulento com uma vazão de  $0,48 \text{ m}^3/\text{h}$  em sistema de *looping* de PVC contendo um tanque de capacidade de 30 L por um período de 8 dias. Nestes experimentos foram conectadas amostras de aço AISI 1020 variando a concentração de oxigênio dissolvido no meio a fim de investigar a influência deste parâmetro na formação de biofilmes

Determinou-se a população microbiana nestes experimentos usando a técnica de número mais provável exceto os fungos que foram quantificados por unidades formadoras de colônias (UFC). Notou-se que todos os microorganismos analisados apresentaram sensibilidade à variação do teor de oxigênio dissolvido no meio, pois reduzindo a concentração de oxigênio de 6,4 para 0,08 ppm levou a seguinte redução da população microbiana ( $6,03 \pm 2,9 \times 10^7$ ) para ( $5,75 \pm 2,8 \times 10^4$ ) de células de bactérias aeróbicas  $/\text{cm}^2$ . As células das bactérias anaeróbicas diminuíram de ( $6,03 \pm 2,9 \times 10^7$ ) para ( $1,05 \pm 0,6 \times 10^3$ ) células/ $\text{cm}^2$ ; ( $5,75 \pm 2,7 \times 10^7$ ) para ( $1,91 \pm 1,0 \times 10^5$ ) células/ $\text{cm}^2$  de (ferrobactérias); ( $2,19 \pm 1,2 \times 10^3$ ) UFC/ $\text{cm}^3$  para a ausência de fungos.

A presença de biofilmes influenciou o processo de corrosão, onde verificou-se que a corrente galvânica estabelecida entre o cátodo e o ânodo caiu drasticamente após a formação dos biofilmes. Além disso, as medidas de taxa de corrosão obtidas através de eletrodos de LPR revelaram valores 10 vezes menores que aqueles obtidos por medidas diretas de perda de massa das amostras metálicas, provavelmente devido ao fato destes eletrodos não considerarem as perdas relacionadas ao processo de corrosão localizada.

A taxa de corrosão apresentada durante os experimentos também revelou uma redução no processo de deterioração nas amostras de aço em função do teor de oxigênio dissolvido no meio (6,40 para 0,08 ppm), onde verificou uma queda na taxa de corrosão de 14,0 para 0,98 mm/ano, segunda análises diretas de perda de massa.

CHAVES 2004 [7] em seu estudo monitorou a cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável, investigando a influência de diferentes fatores na formação de biofilmes a partir da quantificação do número de bactérias totais e cultiváveis. Os fatores estudados foram o tipo da superfície, o tipo do material em contato com a água

potável, as condições do escoamento hidráulico e a quantidade de matéria orgânica biodegradável no meio (nutrientes).

CHAVES 2004 [7] fez diversos ensaios montando um sistema de células de fluxo e testando simultaneamente dois substratos diferentes: o PVC e o aço AISI 316. Para estes ensaios testou o regime de escoamento turbulento e o laminar com e sem adição de nutrientes. A quantificação das bactérias cultiváveis foi efetuada em dois meios de cultura o R<sub>2</sub>A e o TSA, a fim de estudar a influência do meio na contagem de bactérias heterotróficas em placa. Utilizou também, várias técnicas microscópicas com o objetivo de investigar a influência de diversos fatores na arquitetura de biofilmes “maduros”. Conforme o que se observou nos resultados CHAVES 2004 [7] pode concluir que o acúmulo de biofilmes nas tubulações das redes de distribuição de água potável depende da concentração de nutrientes presentes no meio, o uso de condições turbulentas ao invés de laminares e o uso de PVC ao invés de aço inoxidável. Com relação aos meios de culturas utilizados, o meio R<sub>2</sub>A foi o que apresentou o maior crescimento microbiano em água potável, e a utilização das técnicas microscópicas revelou que os biofilmes não são constituídos apenas por bactérias uma vez que se encontrou também fungos (leveduras) e protozoários.

MARQUES 2004 [49] estudou o comportamento de eletrodos de platina sob a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* baseando-se em voltametria cíclica (VC). Neste trabalho MARQUES 2004 [49] também buscou meios para limpar o eletrodo de platina ao final de cada monitorização a buscando eliminar todo o biofilme formado sobre o eletrodo. O procedimento experimental deste trabalho seguiu três etapas: detectar o biofilme na superfície do eletrodo de platina, estudar o efeito da variação das condições experimentais na formação do biofilme e verificar a influência da formação de bolhas de hidrogênio no descolamento do biofilme.

Com o objetivo de testar a (VC) como uma técnica de detecção da formação de biofilme, primeiramente foi induzido o crescimento do biofilme sobre a superfície do eletrodo de platina durante diferentes períodos de tempo e, ao final mediu-se a altura do pico de dessorção de hidrogênio determinando a área do eletrodo coberta pelo biofilme. Os resultados mostraram que a altura do pico de dessorção de hidrogênio diminui conforme aumenta a área do eletrodo coberta pelo biofilme. MARQUES 2004 [49] ainda estudou a influência das condições experimentais variando a velocidade de varredura da (VC), o pH da solução empregada e os limites de potencial e observou os seguintes resultados: aumentando a

velocidade de varredura, o biofilme tem uma taxa de descolamento menor. Variando o pH da solução para 4, todas as células aparecem mortas e o descolamento do biofilme é significativo e finalmente ao aumentar o limite do potencial positivo até 1,5 V aumenta o número de células mortas. Porém, o descolamento de todas as células do biofilme ocorre quando se aumenta o limite negativo para -2,0 V. Tal descolamento se deu nestas condições porque houve a formação de bolhas de hidrogênio que promoveram a remoção mecânica. Na terceira parte deste trabalho estudou-se a influência da formação de bolhas de hidrogênio no desprendimento de biofilmes de diferentes idades e verificou-se que quanto mais velho o biofilme maior é o tempo de formação de bolhas de hidrogênio necessárias para removê-lo. Além disso, observou-se que para os biofilmes mais velhos deste experimento (7 dias) não foi possível limpar completamente a superfície do eletrodo colonizada por *Pseudomonas fluorescens*. Portanto, a técnica de (VC) pode ser usada para monitorar a formação de biofilmes na superfície dos eletrodos de platina e a evolução de bolhas de hidrogênio provoca o descolamento do biofilme presentes na superfície dos eletrodos de platina.

#### **3.3.4.1 Composição do biofilme**

Os biofilmes são constituídos por:

- Água;
- Microorganismos;
- Substâncias poliméricas extracelulares (SPE);
- Partículas retidas (areias, argilas e matéria orgânica);
- Substâncias dissolvidas (produtos de corrosão);

A água é a fração mais significativa de toda a massa do biofilme variando em torno de 70 e 95%. Já, os microorganismos correspondem a não mais que 10% de toda a massa do biofilme. As SPE representam entre 70 e 95% de toda a matéria orgânica seca do biofilme e a

composição química predominante nas SPE é de polissacarídeos, podendo apresentar pequenas parcelas de proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios [25, 26, 27].

#### **3.3.4.2 Etapas de formação do biofilme**

As principais etapas envolvidas na formação de um biofilme são as seguintes:

- 1) Formação do filme condicionador;
- 2) Adesão inicial dos microorganismos;
- 3) Produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE);
- 4) Maturação do biofilme;
- 5) Desprendimento de porções de biofilme.

##### **3.3.4.2.1 Formação do “filme condicionador”**

A formação do filme condicionador ocorre a partir da adsorção da matéria orgânica na superfície sólida em contato com o meio circundante. O filme condicionador se estabelece logo entre 5 e 10 segundos após a superfície sólida limpa entrar em contato com o meio circundante. Porém, a velocidade com que se forma este filme condicionador depende da concentração de matéria orgânica do meio aquoso, das condições hidrodinâmicas e das condições superficiais do suporte sólido, tais como a rugosidade [54].

O filme condicionador altera as características fisicoquímicas da superfície do metal contribuindo para que haja a colonização primária dos microorganismos sobre a superfície sólida condicionada. Em alguns casos pode reduzir a adesão destes a superfície sólida, mas na grande maioria dos casos, o filme condicionador auxilia na adesão dos microorganismos, já que as moléculas orgânicas formam uma cadeia polimérica e estabelecem com as células

microbianas ligações mais fortes, proporcionando uma adesão mais firme, estável e irreversível dos microorganismos à superfície do sólido, [54] conforme a Figura 12.



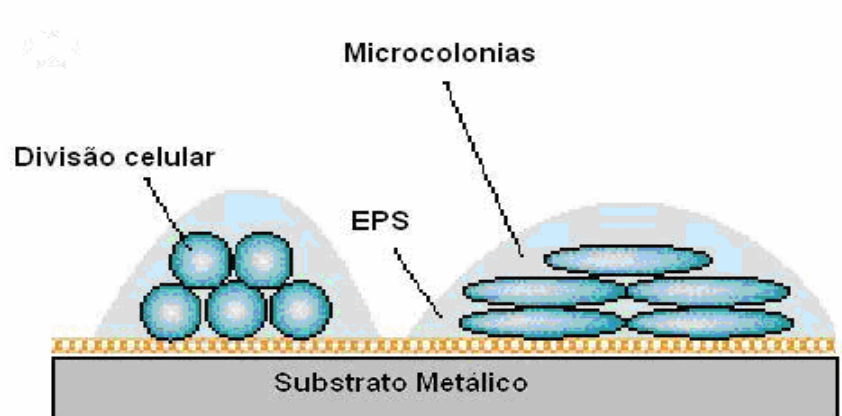
**Figura 12:** Colonização primária de um substrato metálico

Fonte: <<http://www.unb.br/ib/microbiologia/biofilme.html>>

#### 3.3.4.2.2 Adesão inicial dos microorganismos

Com a formação do filme condicionador dá-se início à segunda fase, que é a adesão inicial das células microbianas à superfície sólida. Isto acontece por que há o transporte das bactérias contidas no fluido circundante para o material sólido em contato com este meio. É nesta etapa que ocorre a interação célula-superfície. Contudo, apesar dos genes da produção de polímeros extracelulares serem ativados após 15 minutos de contato entre microorganismos e superfície, considera-se esta uma interação reversível, pois ainda é possível ter células retornando a forma de vida *planctônica* [38].

O mecanismo de transporte das células ocorre a partir de um gradiente de concentração de microorganismos entre o seio da solução e a superfície condicionada, bem como por meio ativo, utilizando-se de células móveis, que são as estruturas filamentosas de locomoção (flagelos, pili e fibrilas), estas estruturas ajudam na mobilidade e adesão inicial dos microorganismos. A Figura 13 representa esquematicamente a etapa de adesão inicial dos microorganismos [38].



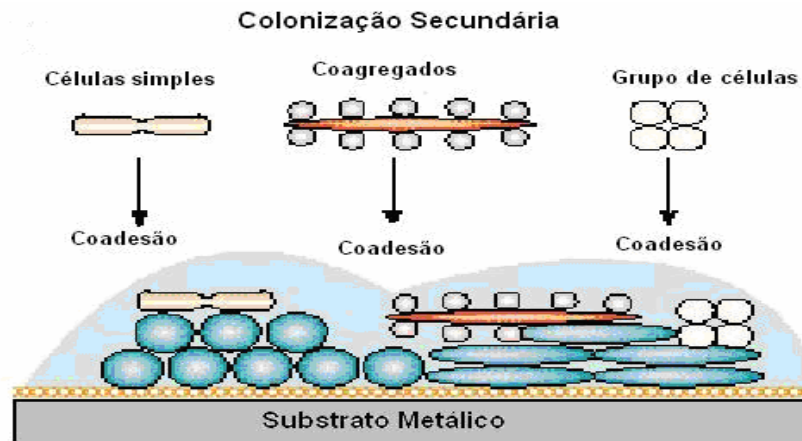
**Figura 13:** Crescimento, divisão celular e produção de polímeros extracelulares, mantendo as células aderidas.

Fonte: <<http://www.unb.br/ib/microbiologia/biofilme.html>>

#### **3.3.4.2.3 Produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE)**

Esta etapa caracteriza-se pela adesão irreversível, aproximadamente 2 horas após a adesão inicial das células. Nesta fase há também a colonização por microorganismos secundários, uma vez que os colonizadores primários contribuem para a modificação da superfície sólida por meio de uma produção significativa de SPE condicionando a adesão de outras espécies de microorganismos, originando em um biofilme jovem de multiespécies conforme é mostrado na Figura 14 [39].

Nesta fase tem-se a SPE como principal força de ligação entre a célula e a superfície metálica, tendo ainda nesta etapa a mobilidade celular minimizada, e os genes envolvidos na comunicação celular e produção de SPE em máxima atividade [39].

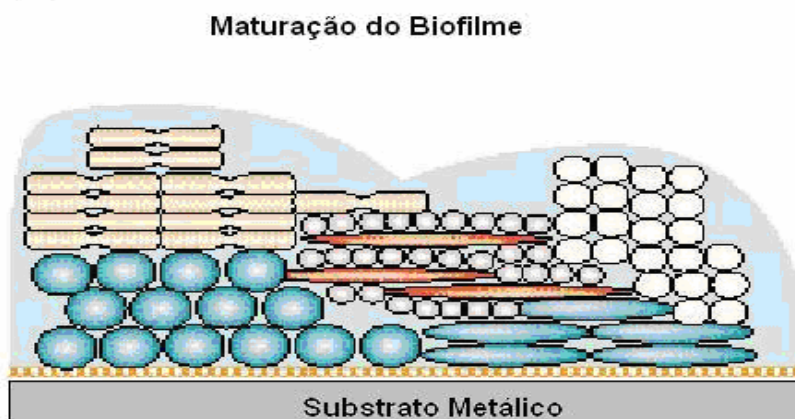


**Figura 14:** Início da formação da arquitetura do biofilme  
 Fonte: <<http://www.unb.br/ib/microbiologia/biofilme.html>>

### 3.3.4.2.4 Maturação do biofilme

Na maturação acontece um rearranjo estrutural do biofilme, à redistribuição das bactérias bem como o aparecimento de canais e poros onde há difusão de nutrientes. Esta fase caracteriza-se também pela produção de grandes quantidades de SPE e aumento da densidade celular motivada pela divisão celular, redistribuição das colônias e a adesão de outras células *planctônicas*, pois os microorganismos aderidos têm a capacidade de estimular as células ainda *planctônicas* à *sésseis*[40].

A Figura 15 ilustra a fase de maturação do biofilme.



**Figura 15:** Maturação e formação de mosaicos coloniais no biofilme maduro.  
 Fonte: <<http://www.unb.br/ib/microbiologia/biofilme.html>>



### 3.3.4.2.5 Desprendimento de porções de biofilme

Nesta fase ocorre a dispersão de células do biofilme por meio de mecanismos físicos, químicos ou biológicos.

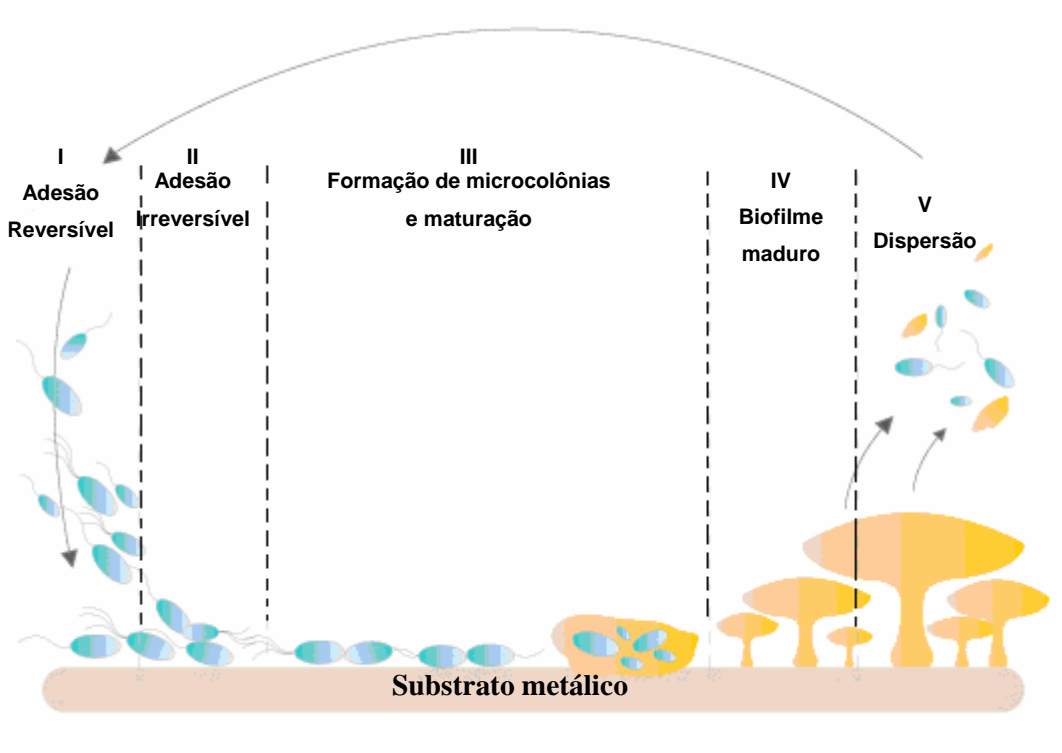
Fisicamente, o desprendimento do biofilme pode ocorrer a partir de uma erosão superficial, abrasão ou formação de gases.

A erosão superficial remove fragmentos da superfície do biofilme devido a alterações no fluxo do fluido circundante. Já a remoção do biofilme por abrasão ocorre por meio de colisões de partículas sólidas em suspensão com a superfície do biofilme. Outro mecanismo físico que remove o biofilme é a formação de bolhas de gás. Estas bolhas de gás enfraquecem a estrutura do biofilme fazendo com que haja o desprendimento de porções da matriz polimérica [41].

Quimicamente, o desprendimento do biofilme pode ocorrer pela adição de agentes químicos antimicrobianos que geralmente são os biocidas. Além disso, mudanças de pH, quelatação de cátions polivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e variações nas propriedades químicas do substrato podem contribuir para a desestabilização do biofilme [40].

As causas biológicas provocam de forma aleatória o descolamento do biofilme, sendo que isto é resultado da transição das células *sésseis* à *planctônicas*. O fator que estimula as células a voltar para o seu estado *planctônico* é a escassez de nutrientes, devido ao aumento da densidade do biofilme [55].

Outras causas biológicas podem estar relacionadas com a divisão celular, com a excreção de enzimas por algumas espécies que degradam as SPE de outras, ou ainda pode ocorrer ataque de predadores, tais como o de protozoários que se alimentam na superfície do biofilme. A Figura 16 ilustra todas as etapas de formação do biofilme.

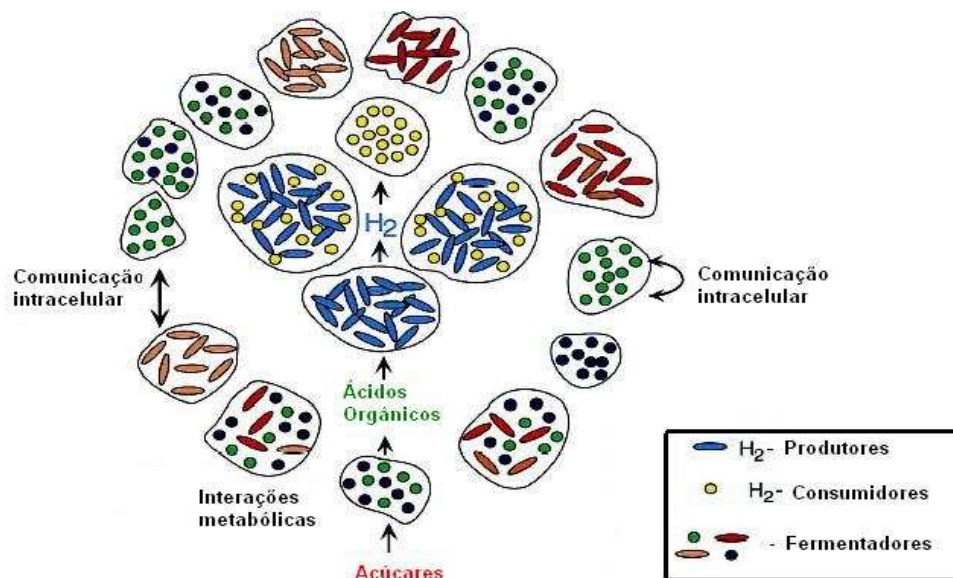


**Figura 16:** Etapas de formação de um biofilme até o desprendimento de células, para evitar competitividade de nutrientes

Fonte: <[www.e-escola.pt/topico.asp?id=354](http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354)>

### 3.3.4.3 Conformação estrutural dos biofilmes

Os biofilmes não são simples camadas viscosas contendo organismos. Estes, representam sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas. As microcolônias que compõem um biofilme podem ser de uma ou várias espécies, dependendo das condições ambientais conforme mostra a Figura 17 [28].



**Figura 17:** Estrutura organizada do biofilme

Fonte: <<http://www.unb.br/ib/microbiologia/biofilme.html>>

O biofilme corresponde a uma "entidade" dinâmica, de acordo com os microorganismos que o compõem têm-se condições físicas, químicas e biológicas distintas e estas alterações fazem com que cada biofilme seja único. Na Figura 17 demonstra-se a capacidade organizacional dos microorganismos no biofilme. As quatro microcolônias centrais correspondem a microorganismos que geram e consomem hidrogênio.

Os microorganismos fermentadores utilizam açúcares e produzem ácidos orgânicos, que são utilizados pelos produtores de hidrogênio. Portanto, no mesmo biofilme pode-se encontrar bactérias aeróbicas na camada superficial (fermentadoras) e bactérias anaeróbicas no interior do biofilme.

Além disso, em todas as etapas de estruturação e organização de um biofilme existe a comunicação célula-célula por meio de moléculas sinalizadoras [28].

Outros aspectos notáveis na arquitetura do biofilme são suas estruturas elásticas, cujo grau de elasticidade depende da interação das SPE com o substrato metálico. Portanto, a elasticidade, formato, espessura, alongamento, densidade e rigidez dependem das condições físico-químicas do meio bem como da presença de fluxo pois, em virtude do atrito mecânico, os biofilmes formados em meios com fluxo contínuo são geralmente mais rígidos e alongados [40].

Os biofilmes também possuem microcanais internos, que são importantes na difusão de nutrientes, água, no escoamento de metabólitos e distribuição de moléculas sinalizadoras [42].

CHAVES 2004 [7] em seu trabalho identificou 14 espécies diferentes de bactérias presentes na água potável que alimentava seu sistema de célula de fluxo e que colonizaram a superfície do PVC e do aço AISI 316. Constatou que, das 14 espécies que formaram o biofilme sobre os substratos sólidos uma era hidrofóbica (*Brevundimonas diminuta* SP1) e as outras treze espécies foram consideradas hidrofílicas, sendo a *Comamonas acidivorans* SP1 e SP3 a mais hidrofílica. Foram consideradas como menos hidrofílicas a *Acinetobacter lwoffii* SP1 e *Aeromonas salmonicida* spp e *salmonicida* SP1. Em seu estudo CHAVES 2004 [7] fez a caracterização das propriedades superficiais do PVC e do aço 316 e concluiu que tanto o PVC como o aço 316 tem propriedades superficiais hidrofóbicas, sendo o aço 316 ligeiramente mais hidrofóbico que o PVC. A partir dos resultados obtidos verificou-se que a superfície do aço é mais favorável à adesão de todas as 14 bactérias identificadas na presente pesquisa comparando-se com o PVC, e a espécie mais hidrofóbica *Brevundimonas diminuta* SP1 é a espécie que mostrou uma adesão mais favorável para qualquer uma das superfícies de adesão estudadas, e a bactéria *Comamonas acidivorans* SP1 considerada a mais hidrofílica é a menos favorável a se aderir à superfície do PVC e do aço 316. Porém, sua adesão ocorre após a superfície do substrato ser colonizada primeiramente pelas bactérias cujas características superficiais mostraram ser mais favorável à adesão (mais hidrofóbicas).

#### **3.3.4.4 Principais fatores que contribuem para a formação do biofilme**

Os fatores que contribuem para a formação do biofilme são:

- 1) pH;
- 2) Temperatura;
- 3) Concentração de nutrientes do meio;
- 4) Rugosidade da superfície sólida.

#### **3.3.4.4.1 pH**

De acordo com a taxa de crescimento e o pH do meio, os microorganismos podem ser classificados em três grupos: acidófilos, neutrófilos e basófilos. A maioria dos biofilmes formam-se em pH neutro, pois a variação do pH para valores acima ou abaixo de 7 pode afetar a atividade microbiológica do biofilme e conseqüentemente o desenvolvimento desta matriz gelatinosa [29].

#### **3.3.4.4.2 Temperatura**

Em temperaturas elevadas ocorre a desnaturação das proteínas que compõe os microorganismos, resultando na redução da taxa de crescimento. A temperatura na qual os efeitos destrutivos são intensos é conhecida como limite máximo de temperatura. Porém a temperatura onde se registra a maior taxa de crescimento dos microorganismos é designada de temperatura ótima. Por conseguinte, se reduzir a temperatura e diminuir a taxa de crescimento dos microorganismos até cessar, este será o valor da temperatura ao limite mínimo. Cada microorganismo tem seus valores distintos para limites mínimos e máximos, bem como temperatura ótima para crescimento. Quando se trata de bactérias estes valores nos quais o crescimento é máximo variam bastante [30].

#### **3.3.4.4.3 Concentração de nutrientes**

No instante em que um material metálico é colocado em contato com o meio aquoso, inevitavelmente ocorre adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas presentes neste meio, levando à formação de um meio condicionado. Em seguida, ocorre a fixação de microorganismos a este meio rico em nutrientes, o crescimento celular e a produção de exopolímeros (SPE) [31].

Quanto maior é a concentração de nutrientes disponíveis sob a forma de carbono assimilável, maior será o crescimento microbiano e maior será a diversidade de microorganismos na composição do biofilme. Em vários processos fabris (papel e celulose, petroquímico, alcooleiro e saneamento), há disponibilidade de nutrientes sob forma de

carbono assimilável, devido à matéria orgânica em suspensão transportada pela própria água a partir do ponto de captação (rios e poços artesianos) [31].

#### **3.3.4.4 Rugosidade da superfície metálica**

O aumento da rugosidade da superfície metálica tem sido associado ao aumento da retenção microbiana. A irregularidade da superfície do metal favorece a proteção celular dos microorganismos e, além disso, as superfícies rugosas contribuem para o aumento da área superficial disponível à adesão [32, 33].

PIMENTA e PEPE 2003 [8] estudaram a corrosão induzida por microorganismos em aços inoxidáveis austeníticos AISI 304 e 316 aplicados em sistemas de distribuição de água. Este trabalho teve como objetivo reportar casos de estudos relativos a situações industriais detectadas. Para isso coletaram amostras dos substratos metálicos AISI 304 e 316 em uma estação de tratamento de água para primeiramente caracterizá-las utilizando as técnicas de radiografia industrial (RI) e microscopia óptica (MO). Fizeram também a análise da composição química dos substratos metálicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, além disso, fizeram análises da composição fisicoquímica e microbiológica da água utilizada no meio de estudo. Após imergir as amostras de aço no meio com bactérias fez-se a análise destas a partir das técnicas de MEV, EDX e difração de raios-X a fim de verificar a formação de biofilmes e de corrosão induzida por microorganismos.

Nas micrografias observaram que as amostras selecionadas para o estudo apresentaram ruptura junto ao cordão de solda e depósitos de coloração acastanhada, típica de óxido de ferro. A radiografia industrial mostrou defeitos nos cordões de solda que liga as tubulações. Com a técnica de difração de raios-X fez-se a análise química das amostras metálicas e revelou que tanto o aço AISI 304 como o aço AISI 316, utilizados neste estudo estão dentro das especificações. Nas análises fisicoquímicas das amostras de água coletadas encontrou-se valores de pH entre 7,2 e 7,3 e concentrações de cloretos entre 120 e 128 mg L<sup>-1</sup>. Já nas análises microbiológicas foi detectada a presença de bactérias redutoras de sulfato.

Nas amostras de aço verificaram falhas na solda e indícios de corrosão localizada a 20 mm do cordão de solda. A zona soldada apresentou uma rugosidade superficial mais acentuada devido à quebra do filme passivante ou irregularidades decorrentes na solda. Com o MEV pôde-se verificar a formação de biofilmes que se acumularam na superfície das

amostras de aço, cuja composição ficou caracterizada pela presença de matéria orgânica/inorgânica e biológica. A partir de depósitos removidos da região onde se observou corrosão, a difração de raios X mostrou a ocorrência de FeS nos produtos de corrosão, que pode estar relacionado à atividade metabólica de bactérias redutoras de sulfato. A rugosidade da superfície favoreceu a fixação das bactérias e conseqüentemente, a produção de biofilme, pois a maior incidência de FeS foi encontrada nas imediações dos cordões de solda.

### 3.4 Bactérias

As bactérias são os menores e mais simples seres vivos do ponto de vista estrutural, porém, são seres complexos do ponto de vista bioquímico e metabólico, permitindo-lhe a adaptação aos mais variados tipos de habitat. É por esta razão que 98% dos microorganismos que compõem um biofilme são de bactérias[5].

Embora existam exemplos de corrosão atribuídos a fungos e algas, a corrosão microbiológica se processa quase que exclusivamente sob a influência de bactérias, visto que estas vivem e se reproduzem em pH entre 0,5 e 13, temperaturas que vão de -12<sup>o</sup>C a 110<sup>o</sup>C sob pressões que podem ir até 1400 bar. Na tabela 5 estão apresentadas as principais bactérias causadoras de corrosão, bem como as condições ambientais onde estes microorganismos têm sua máxima atividade metabólica [34].

**Tabela 5:** Algumas bactérias associadas a corrosão microbiológica

Gênero ou espécie	pH	Temperatura	Necessidade de oxigênio	Materiais afetados
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	4 – 8	10 – 40	Anaeróbica	Ferro, aço, Alumínio, Zinco e Cobre
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	0,5 – 8	10 – 40	Aeróbica	Ferro e aço
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	1 – 7	10 – 40	Aeróbica	Ferro e aço
<i>Gallionella</i>	7 – 10	20 – 40	Aeróbica	Ferro e aço
<i>Pseudomonas</i>	4 – 9	20 – 40	Aeróbica	Ferro e aço
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 – 8	20 – 40	Aeróbica	Ferro e aço

ALVES et al 2008 [50] verificaram a ação do *Thiobacillus thiooxidans* na corrosão do aço inoxidável 430 em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, empregando as técnicas de gravimetria, microscopia óptica e voltametria cíclica. Os resultados revelaram que com a presença desta bactéria no meio, ocorre um aumento na velocidade de corrosão do aço para o tempo de imersão de 5 horas. Nas micrografias ficou evidente a formação de biofilme, comparando a

amostra antes e depois da imersão no meio com as bactérias. A voltametria cíclica mostrou que a corrosão do aço 430 foi generalizada, concluindo-se que a *Thiobacillus thiooxidans* forma um biofilme na superfície do aço inoxidável 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  e, após um longo período de imersão, o aço sofre uma corrosão generalizada.

VIEIRA et al 2008 [18] fizeram um estudo sobre microorganismos com potencial a biocorrosão em superfícies de aço ABNT 1010. O meio utilizado para investigar o processo de corrosão foi baseado na simulação de um sistema estático (biorreator) contendo água do mar da região do complexo industrial de SUAPE (Cabo de Santo Agostinho- PE). As amostras de aço ABNT 1010 utilizadas no experimento tinham as dimensões  $54 \times 54 \times 3 \text{ mm}$  e foram imersas no biorreator contendo 11 L de água do mar. A água coletada para os ensaios foi monitorada com análises físicoquímicas e microbiológicas a cada 15 dias, durante 4 meses. Nas análises microbiológicas da água foi detectada a presença de microorganismos com potencial a biocorrosão tais como *Pseudomonas* e *Ferrobactérias*, onde observou-se uma concentração relevante de *Ferrobactérias*. Fizeram ainda, análises do biofilme formado sobre as amostras de aço, e também detectou-se a presença de *Pseudomonas* e *Ferrobactérias*. A primeira análise visual do substrato metálico utilizado nos testes se deu após 55 dias e uma segunda análise visual foi feita após um período de 110 dias. Em ambos os períodos o aço ABNT 1010 apresentou uma taxa de corrosão de  $0,039 \text{ mm/ano}$ , sendo classificada como uma corrosão moderada. A corrosão generalizada observada nas amostras de aço ABNT 1010 foi causada pela salinidade do meio, bem como pela ação dos microorganismos que aderidos a esta superfície sólida formaram um biofilme composto por *Ferrobactérias*, que têm a capacidade de oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , e por *Pseudomonas* responsáveis pela produção de SPE.

DA SILVA et al 2008 [51] estudaram a corrosão do aço carbono em meio de sulfato na presença da bactéria *Salmolella anatum*. Seu trabalho procedeu a partir da imersão de amostras de aço carbono em meio de sulfato com pH inicial de 7,3. Após 21 dias de imersão, as técnicas empregadas para este trabalho foram: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva por raios X (EDX), perda de massa em termos de concentração total de íons Ferro, e medidas do pH. Observou-se nas micrografias em MEV a formação de biofilme após 1 dia de imersão da amostra de aço no meio e, logo após, este biofilme foi removido com álcool anidro e água, e a amostra foi micrografada novamente. A micrografia feita no MEV após a remoção do biofilme evidenciou a formação de corrosão localizada do tipo pite que se agravou continuamente durante o período do estudo. Nas



amostras de aço micrografadas após 21 dias de imersão pôde-se observar uma corrosão bastante acentuada, com formação de produtos inorgânicos insolúveis sobre a superfície do aço carbono bem como o acúmulo de material biológico nesta superfície. Com base nos espectros obtidos das análises de EDX, notou-se um aumento da concentração de carbono, na superfície das amostras de aço carbono. Isto sugere que simultaneamente, está havendo a dissolução do Ferro na superfície do metal devido a formação do biofilme. Para os ensaios de perda de massa, notou-se que no meio com a presença da bactéria *Salmoella anatum* houve corrosão acentuada comparando com a amostra imersa no meio sem a bactéria. Estes resultados demonstraram o efeito catalítico da bactéria *Salmoella anatum* sobre um processo corrosivo. Com o monitoramento do pH, notou-se que no meio sem a bactéria o pH manteve-se em 7, em contrapartida, o pH do meio com a bactéria foi diminuindo com o passar do tempo, chegando ao 21<sup>o</sup> dia em 5,7. Este comportamento evidenciou que a presença da bactéria no meio pode alterar as condições fisicoquímicas deste, devido a suas atividades metabólicas, e ao consumo de nutrientes. A degradação da glicose por bactérias do gênero *Salmonella* tem como resultado a produção de ácidos, podendo ocasionar a diminuição do pH do meio.

TEIXEIRA et al 2002 [52] aplicaram técnicas eletroquímicas no estudo da dissolução oxidativa do sulfeto metálico natural, covelita (CuS) em meio composto por 0,625 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,625 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O a pH 1,8 sem e com a bactéria *Thiobacillus ferrooxidans*. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram o potencial de circuito aberto (PCA) num período de incubação de 0, 2, 7 e 14 dias e voltametria cíclica (VC). Para a caracterização da amostra de covelita utilizaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia de energia dispersiva por raios X (EDX). Na caracterização da amostra de covelita (CuS) os difratogramas obtidos revelaram uma concentração de 55,50% de Cu, 30,41% de S, 3,52% de Fe e 1,32% de Si. Com as micrografias obtidas em MEV notou-se que há uma uniformidade na distribuição dos elementos (Cu, S, Fe e Si) na superfície deste mineral, bem como uma superfície porosa e irregular. Nos ensaios de PCA realizados sem a presença da bactéria no meio pôde-se observar que não houve mudança significativa no potencial para os diferentes períodos de incubação, propondo que a estabilidade do potencial é devida à formação de uma camada passiva de enxofre sobre a superfície do mineral, que foi comprovada por EDX após o tempo de 7 dias. Já, para as amostras incubadas na solução com os microorganismos presentes notou-se que até o período de 7 dias, houve uma pequena

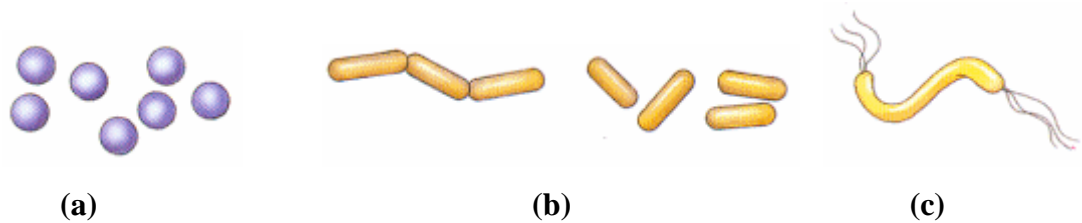
variação no potencial em torno de 30mV (ECS). Porém os resultados de potencial de circuito aberto para o tempo de 14 dias mostraram uma queda brusca no potencial, devida à provável oxidação do enxofre elementar pela bactéria, sendo que esta oxidação resulta na produção de ácido sulfúrico, daí a constatação da diminuição do pH que foi monitorado durante o experimento. Comparando os voltamogramas cíclicos levantados com a amostra de covelita sem a bactéria e com a bactéria presente no meio, observaram uma diminuição do pico oxidativo do Fe e do S. Isto se deve ao fato de ter havido o consumo de S e do Fe pelos microorganismos. Portanto, os ensaios eletroquímicos de potencial de circuito aberto sem a presença de microorganismos mostraram que é formada uma camada de enxofre sobre a superfície do mineral e na presença da bactéria ocorre um rompimento desta camada natural de enxofre por meio da atividade metabólica dos microorganismos, o que acelera a oxidação deste mineral. A voltametria cíclica demonstrou que na presença da bactéria mais o Fe<sup>2+</sup> ocorre a corrosão do mineral, uma vez que a *Thiobacillus ferrooxidans* oxida o Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> provocando corrosão no mineral covelita, que apresenta em sua composição teores de Fe em torno de 3,52%.

#### **3.4.1 Características gerais das bactérias**

As bactérias são unicelulares, geralmente apresentam três formas básicas [35]:

- Esféricas (cocos);
  
- Bastão (bacilo);
  
- Espiral (espirilo).

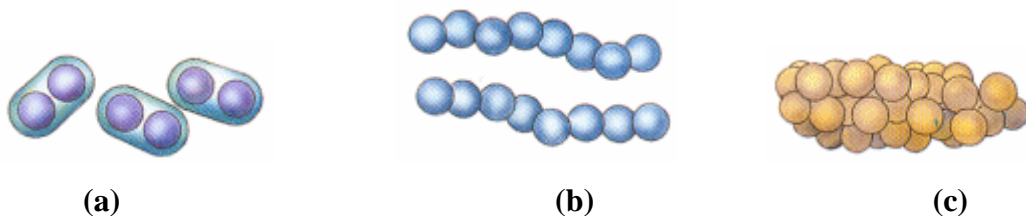
A Figura 18 a até c, mostra as três formas citadas.



**Figura 18:** (a) cocos; (b) bacilos; (c) esperílo

Fonte: <[http://www.infoescola.com/imagens/faecimg\\_monera5.gif](http://www.infoescola.com/imagens/faecimg_monera5.gif)>

As células podem ser encontradas em grupos, tais como diplococos, estreptococos e estafilococos, ou ainda podem se agrupar em outras variações, vide Figura 19 a até c.



**Figura 19:** (a) diplococos; (b) estreptococos; (c) estafilococos

Fonte: <[http://www.infoescola.com/imagens/faecimg\\_monera5.gif](http://www.infoescola.com/imagens/faecimg_monera5.gif)>

Nas culturas cultivadas em meios impróprios, algumas espécies de bactérias perdem sua característica morfológica assumindo formas totalmente diversas da forma normal. A maioria das bactérias são tão pequenas que só podem ser vistas com um microscópio ótico e em grande aumento [34].

O diâmetro das bactérias pode variar de 0,2 a 1,5  $\mu\text{m}$  e o comprimento de 1 a 6  $\mu\text{m}$ , podendo algumas espécies apresentar células maiores [35].

Uma característica bastante relevante que as bactérias possuem é a relação superfície/volume. Esta relação superfície/volume das bactérias indica que nenhuma parte interna da célula está muito longe da superfície, isto faz com que os nutrientes alcancem facilmente todas as partes da célula em pouco tempo [35].

As bactérias absorvem os nutrientes a partir do meio nos quais estas estão inseridas, mas algumas produzem seus próprios nutrientes por meio de fotossíntese ou de processos de síntese. Algumas são fixas e outras são móveis [34].

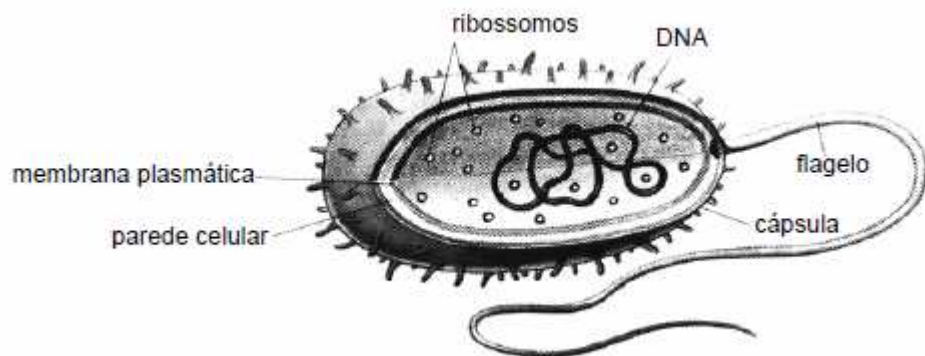
Embora as bactérias sejam celulares, elas não têm um núcleo celular e, deste modo não possuem estruturas intracelulares revestidas por membranas, como é encontrado na maioria

das outras células. Quatro grupos de organismos podem ser diferenciados: organismos Gram-positivos, Gram negativos, Gram-não-reativos e Gram-variáveis [34].

Estruturalmente as células bacterianas consistem em:

- 1) Membrana celular, que geralmente é envolta por uma parede celular e às vezes por uma camada exterior adicional;
- 2) Citoplasma interno com ribossomo, região nuclear que pode conter em alguns casos grânulos ou vesículas;
- 3) Variedade de estruturas externas tais com: cápsulas, flagelos e pili (pêlos).

A Figura 20 mostra um esquema estrutural das bactérias.



**Figura 20:** Estrutura geral de uma bactéria

(Fonte: <http://www.portalimpacto.com.br/docs/01RinaldoVest.F1Aula18pdf>)

#### **3.4.1.1 Parede celular das bactérias**

De acordo com a estrutura e organização da parede celular, as bactérias podem ser divididas em dois grupos: Gram-positivas e Gram negativas.

O termo Gram vem do nome Christian Gram, bacteriologista dinamarquês que no ano de 1884 desenvolveu o método de coloração. Muitas bactérias, tanto as Gram-positivas como

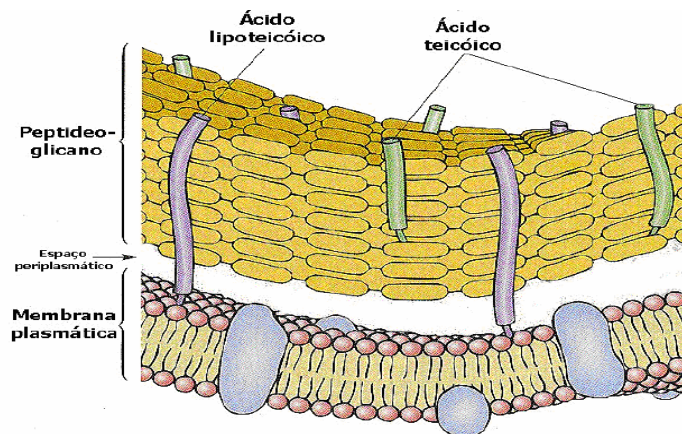
as Gram-negativas, possuem um mosaico cristalino dimensional de moléculas protéicas como sua camada celular mais externa [35].

#### 3.4.1.1.1 Gram-positivas

A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída por:

- Uma membrana citoplasmática;
- Uma camada espessa de peptidoglicano;
- Uma camada externa variável (cápsula).

Na Figura 21 está ilustrada a parede celular das bactérias Gram-positivas, onde o peptidoglicano corresponde a aproximadamente 40 a 90% do seu peso seco. Além disso, a parede concentra ácidos teicóicos que se ligam ao peptidoglicano ou aos lipídios da membrana citoplasmática formando ácido lipoteicóicos [35].



**Figura 21:** Parede celular de bactérias Gram-positivas (Fonte: Prescott et. al., 1996)

### 3.4.1.1.2 Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa, constituída por:

- Membrana citoplasmática (membrana interna), circundada por uma única lâmina de peptidoglicano;
- Membrana externa formada por uma dupla camada lipoprotéica, cuja composição é de lipopolissacarídeos e lipoproteínas;
- Cápsula externa;
- Espaço entre membranas internas e externas (espaço periplasmático).

A quantidade de peptidoglicano na parede das bactérias Gram-negativas não excede mais do que 10% do seu peso seco. Diferente das Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas têm a parede celular formada por duas camadas porém, os dois tipos de parede têm uma camada em comum logo acima da membrana citoplasmática, que é a camada basal, mureína ou peptidoglicano [35].

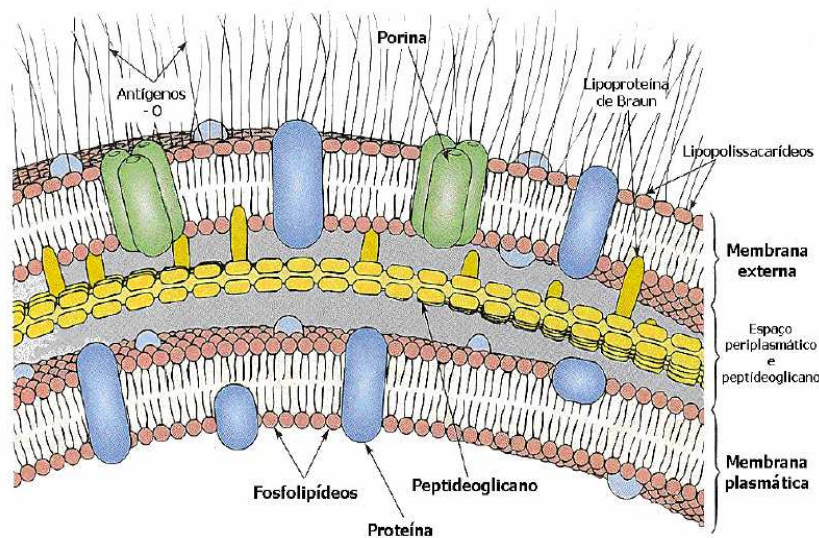
A parede celular das bactérias Gram-positivas tem em sua composição 90% de peptidoglicano, formada geralmente por 20 camadas o restante da parede é formada por ácido teicóico.

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular contém cerca de 10% de peptidoglicano, existindo como uma camada dupla. Assim, quando observadas sob microscopia eletrônica de varredura, as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa de 20 a 80nm, enquanto que as Gram-negativas apresentam uma camada não muito espessa, entre 9 e 20nm [43].

A “membrana” externa está presente apenas nas bactérias Gram-negativas, correspondendo a uma segunda bicamada lipídica que se assemelha à membrana plasmática localizada acima do peptidoglicano, contendo fosfolipídios, lipoproteínas, proteínas e também lipopolissacarídeos [43].

Estudos indicam que a membrana externa e a membrana citoplasmática mantêm contato com os sítios de adesão das bactérias, o que faz acreditar que a junção destas regiões é responsável pela maior rigidez da parede celular das bactérias Gram-negativas além de fixar melhor a membrana externa associada somente ao peptidoglicano [43].

Na Figura 22 há uma representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas.



**Figura 22:** Parede celular de bactérias Gram-negativas

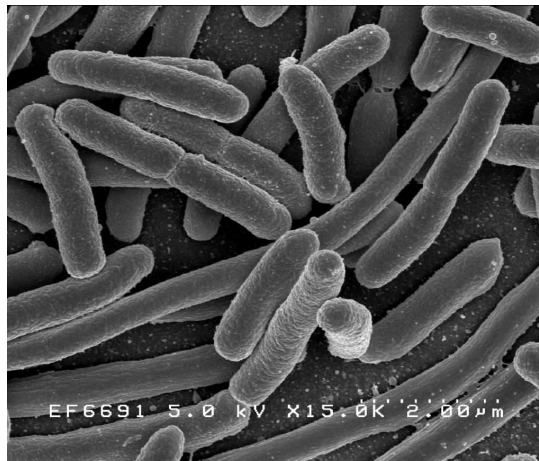
Fonte: [Prescott et. al., 1996]

### 3.4.2 *Escherichia coli*

A *E. coli* foi isolada pela primeira vez em 1975 na Califórnia, coletada de uma mulher com diarreia de sangue. Este microorganismo é capaz de sobreviver em carne moída congelada a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta bactéria demonstrou capacidade de sobreviver à fermentação, desidratação e estocagem de embutidos fermentados a pH 4,8 por mais de dois meses. Estudos determinaram que nem o ácido acético, cítrico ou láctico em concentrações de até 1,5% aplicados em carnes a 20 ou  $55^{\circ}\text{C}$  diminuiriam significativamente a contagem de *E. coli* [36].

A *E. coli* é um dos microorganismos tidos como habitantes naturais da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo

normalmente encontrado nas fezes destes animais. Muitas cepas de *E. coli* não são patogênicas, e classificam-se como bacilos retos, vide Figura 23, são Gram negativos, não formadores de esporos, possuem mobilidade através de flagelos ou são imóveis. A *E. coli* também é classificada como um microorganismo anaeróbio facultativo, ou seja, pode formar colônia em meios ricos de oxigênio ou sem oxigênio e utilizam a D-glicose e outros carboidratos, formando ácido e gás no final de seu metabolismo [37].



**Figura 23:** *Escherichia coli*

(Fonte:<http://pt.wikipedia.org/wiki/imagem:morfologiabactérias.jpg>)



## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Soluções empregadas**

#### **4.1.1 Solução pH 6**

- Água destilada
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Peptona (proteína)

#### **4.1.2 Solução pH 7**

- Água destilada
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- Peptona (proteína)

#### **4.1.3 Solução pH 8**

- Água destilada
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )
- Peptona (proteína)

### **4.2 Eletrodos Empregados**

#### **4.2.1 Eletrodo auxiliar de Platina (Pt) ou contra eletrodo**

É no contra eletrodo, que ocorrerá a semi-reação secundária com a espécie química presente na solução. Possui grande área superficial, no mínimo dez vezes maior que o eletrodo de trabalho a fim de evitar a polarização reversa. O contra eletrodo deve ser de

material inerte, na maioria dos casos utiliza-se a platina, mas também podem ser usados, titânio e grafite [44].

#### **4.2.2 Eletrodo de referência de sulfato mercuroso (ESM)**

O eletrodo de referência é o eletrodo que possui o potencial fixo e serve como referência para o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e não drena corrente elétrica da cela eletroquímica ( $I \approx 0$ ). O eletrodo de referência deve ter resposta rápida e possuir íon comum ao eletrólito empregado nas medidas, a fim de minimizar o potencial de junção [44].

#### **4.2.3 Eletrodo de trabalho aço AISI 316**

É onde ocorre a semi-reação de interesse. Neste trabalho foi utilizado um eletrodo de aço AISI 316 com área de  $0,28\text{cm}^2$  como o ânodo da célula eletroquímica [44].

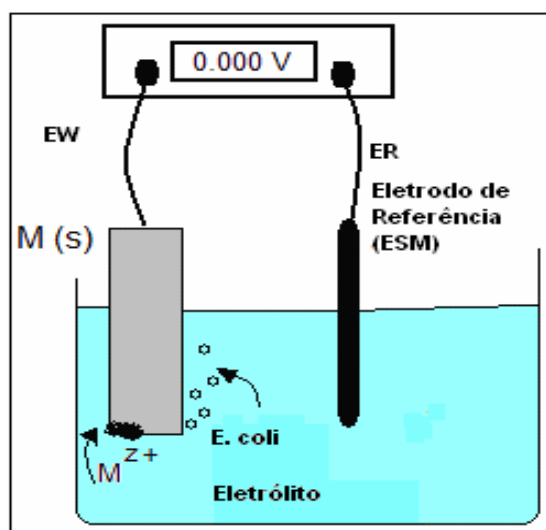
### **4.3 Células eletroquímicas empregadas**

#### **4.3.1 Célula eletroquímica de potencial de circuito aberto**

Os materiais utilizados para compor a célula eletroquímica empregada nas medidas de potencial em circuito aberto foram os seguintes:

- Béquer de 100mL;
- Eletrodo de referência de sulfato mercuroso (ESM);
- Eletrodo de trabalho de aço AISI 316;
- Voltímetro de 3 ½ dígitos;

A Figura 24 mostra a célula eletroquímica montada para as medidas de potencial de circuito aberto.



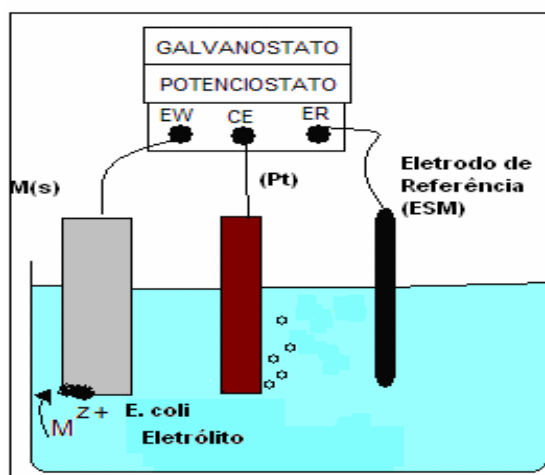
**Figura 24:** Circuito aberto, (EW) Eletrodo de Trabalho aço AISI 316, (ER) Eletrodo de Referência de Sulfato Mercurioso.

#### 4.3.2 Célula eletroquímica de potencial de circuito fechado

Para as medidas de polarização anódica potenciodinâmica (PAP), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) utilizou-se uma célula eletroquímica de circuito fechado, usando-se os seguintes materiais:

- Béquer de 100mL;
- Eletrodo de referência de sulfato mercurioso (ESM);
- Eletrodo de trabalho de aço AISI 316 com área de 0,28cm<sup>2</sup>;
- Contra eletrodo de platina (Pt), área média de 20 cm<sup>2</sup>;
- PC4-300 e EIS-300 da *Gamry Instruments*

A Figura 25 é a representação esquemática da célula eletroquímica de circuito fechado.



**Figura 25:** Célula Eletroquímica de Circuito Fechado, (**EW**) Eletrodo de trabalho (aço AISI 316), (**CE**) Contra Eletrodo (Pt), (**ER**) Eletrodo de Referência (ESM).

#### 4.4 Procedimento experimental

##### 4.4.1 Preparação do meio de cultura

Três meios de cultura foram preparados: pH 6, pH 7 e pH 8, utilizando reagentes de grau analítico e cepas puras de *E. coli* ATCC 25922. As etapas de preparação do meio de cultivo da *E. coli* foram as seguintes:

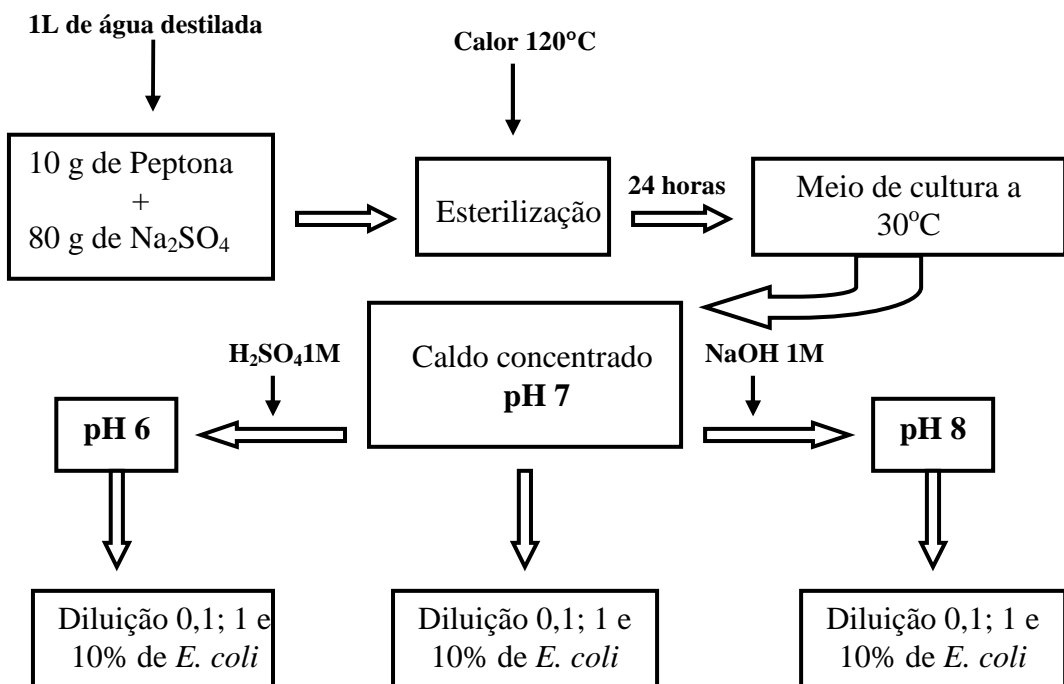
- 1) Adicionou-se em 1L de água destilada, 10g de Peptona (fonte de proteína) e 80g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) que constitui o eletrólito.
- 2) Esterilizou-se a solução em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de  $120^\circ\text{C}$ .
- 3) Após 24 horas com a solução a  $30^\circ\text{C}$ , adicionou-se às cepas de *E. coli* (ATCC 25922), obtendo-se então o caldo concentrado com pH 7.

4) Depois de 48 horas, as bactérias estão com máxima atividade metabólica. Daí, preparou-se em Erlenmeyers três diluições de 100mL com alíquotas de 0,1%, 1% e 10% de caldo concentrado em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , e sem a *E. coli* contendo apenas Peptona em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , mantendo-as a uma temperatura de  $35^\circ\text{C}$ .

5) Na preparação do meio com pH 6, foi adicionado ácido sulfúrico  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , na etapa 4, já descrita.

6) Para obter o meio com pH 8 foi adicionado hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  na etapa 4, descrita anteriormente.

A Figura 26 apresenta o fluxograma 1, que ilustra as etapas de preparação do meio de cultura.



**Figura 26:** Fluxograma 1: Etapas de preparação do meio de cultura.

#### **4.4.2 Preparação das amostras de aço AISI 316**

Antes de realizar os ensaios eletroquímicos, as micrografias no microscópio óptico e em microscopia eletrônica de varredura, as amostras de aço 316 foram preparadas a fim de eliminar sujidades e impurezas. Utilizando uma politriz, lixou-se quatro peças metálicas com lixas SIC de grana 200, 300, 400, 600 e 1200 sucessivamente até limpar a superfície das amostras, por conseguinte as amostras de aço foram lavadas com água destilada e secas com ar quente.

#### **4.4.3 Procedimento experimental para a caracterização óptica**

- 1) Fez-se a imersão de amostras de aço AISI 316 em quatro soluções de 100 mL contendo 0,1%, 1%, 10% do caldo concentrado de *E. coli* em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e no branco (sem bactérias), mantendo-as em uma estufa na temperatura de  $35^\circ\text{C}$ .
- 2) Fez-se análises da superfície das amostras de aço após 1, 4, 8 e 12 horas por meio de microscopia óptica (MO).

##### **4.4.3.1 Procedimento experimental para caracterização em MEV.**

O procedimento experimental no preparo das amostras de aço AISI 316 antes de micrografá-las no microscópio eletrônico de varredura (MEV) seguiu os seguintes passos:

- 1) Preparou-se 300 mL da solução  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  com 10% de *E. coli* em pH 7 a  $35^\circ\text{C}$  e dividiu-se em dois béqueres, cada um com 150mL de solução.

2) Uma amostra de aço AISI 316 foi imersa em um béquer com 150 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5\text{mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* por um período de 24 horas para depois ser micrografada no MEV.

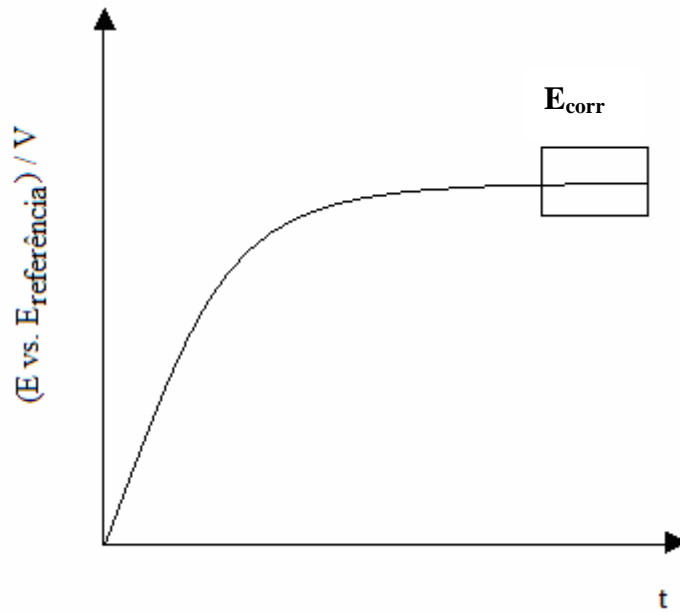
3) Para remover o biofilme, a segunda amostra de aço AISI 316 foi submetida a uma polarização anódica potenciodinâmica a partir de uma célula eletroquímica composta por três eletrodos, sendo um eletrodo de referência de sulfato mercurioso (ESM), um contra eletrodo de Platina (Pt) e um eletrodo de trabalho (amostra de aço AISI 316 de área  $1,72\text{ cm}^2$ ) em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5\text{mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* com potencial de perturbação de 1,4 V/ESM por 600 segundos, para descolamento do biofilme.

## **4.5 Técnicas Empregadas**

### **4.5.1 Caracterização eletroquímica**

#### **4.5.1.1 Potencial de circuito aberto (PCA)**

O objetivo em um sistema de circuito aberto é investigar o potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) de um dado eletrodo de trabalho em estudo. O potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) é medido a partir de um eletrodo de referência (cátodo) e um eletrodo de trabalho (ânodo), antes de se iniciar o processo de polarização. O potencial é anotado em função do tempo até a sua estabilização, por isto também é chamado de potencial de estabilização. No potencial de corrosão a velocidade da reação de oxidação é idêntica à velocidade da reação de redução, portanto a corrente  $J_{\text{ox}} = J_{\text{red}}$ . A Figura 27 mostra uma curva esquemática da medida de potencial de corrosão [56].

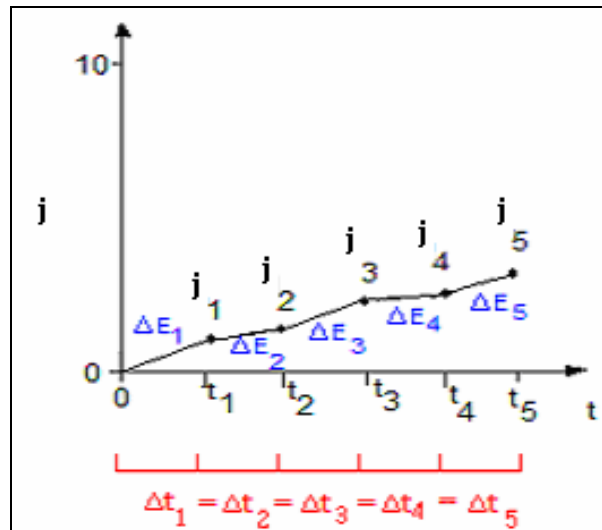


**Figura 27:** Curva esquemática do potencial de circuito aberto para se obter o potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ).

#### 4.5.1.2 Polarização anódica potenciodinâmica (PAP)

A polarização anódica potenciodinâmica ocorre se estabelecendo um salto em potencial ( $\eta = E_2 - E_1$ ) chamado de sobretensão ( $\eta$ ), a partir do potencial de equilíbrio ( $E_1$ ) e anotando-se a corrente em um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) definido. É uma medida ponto a ponto sem a estabilização da densidade de corrente ( $j_1, j_2, j_3, \dots$ ). A Figura 28 mostra uma curva de polarização potenciodinâmica qualquer, em que o tempo ( $t$ ) de medida da densidade decorrente ( $j$ ) é constante. Normalmente, se expressa esta medida em função da velocidade de varredura (v.v) do salto em sobretensão ( $\Delta E$ ). Neste trabalho foi de  $1 \text{ mVs}^{-1}$  [56].





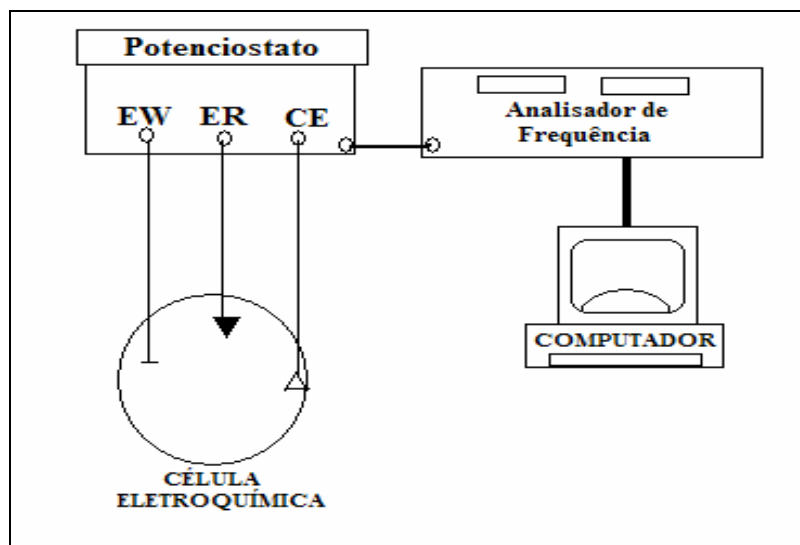
**Figura 28:** Polarização potenciodinâmica.

#### 4.5.1.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE) apresenta como principais vantagens em relação às técnicas de corrente contínua [56]:

- Utilizar pequenos sinais de perturbação, preferência em região linear da curva de polarização, neste trabalho foi de  $\pm 5$  mV;
- Estudar reações de oxidação e medir as taxas de corrosão em meios de baixa condutividade;
- Pode-se obter as resistências de polarização ( $R_p$ ), de transferência de carga ( $R_{TC}$ ) e a capacitância da dupla camada elétrica ( $C_{DE}$ );
- A faixa de frequência estudada neste trabalho foi de 3 kHz a 0,001 Hz.

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) podem ser realizadas de acordo com o sistema apresentado na Figura 29.

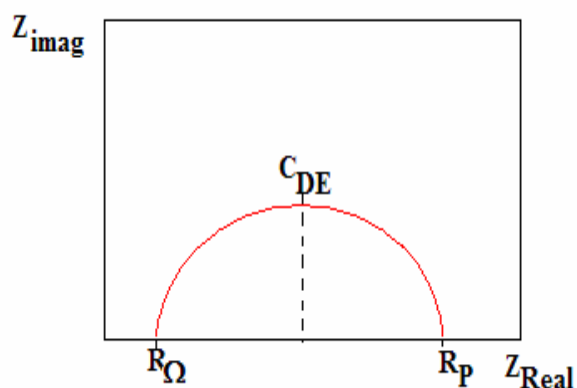


**Figura 29:** Representação esquemática do sistema espectroscópico de impedância eletroquímica.

A impedância eletroquímica é uma técnica que consiste em perturbar um potencial elétrico variável por meio de um potenciostato em uma célula eletroquímica, a fim de se obter a resposta na forma de corrente elétrica da célula que foi submetida à excitação, vide Figura 29.

No arranjo experimental mostrado na Figura 29, a frequência do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho pode variar de mili Hertz ( $10^{-3}$ ) até quilo hertz ( $10^3$ ). Ao mensurar a corrente alternada que passa pela célula eletroquímica obtém-se a impedância  $Z$  e, a partir destes dados de impedância, o sistema pode ser modelado como um circuito elétrico que contém capacitores, resistores e indutores, representando cada fenômeno eletroquímico que ocorre na célula eletroquímica. Desta forma, pode-se quantificar a resistência de polarização ( $R_p$ ), a resistência do eletrólito ( $R_\Omega$ ) e a capacitância da dupla camada elétrica na interface eletrodo solução eletrolítica ( $C_{DE}$ ). A impedância eletroquímica tem sido muito utilizada nos estudos de corrosão metálica, é o método mais empregado no estudo de mecanismos de corrosão [56].

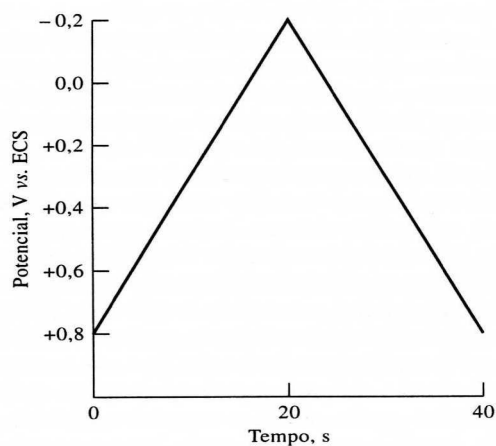
Os diagramas de impedância eletroquímica podem ser registrados em Nyquist ou Bode. Neste trabalho estudou-se os diagramas Nyquist, cuja representação esquemática está na Figura 30 [56].



**Figura 30:** Representação de diagramas Nyquist de EIE.

#### 4.5.1.4 Voltametria cíclica

Em voltametria cíclica, obtêm-se a resposta da corrente de um eletrodo de trabalho de área pequena em uma solução sem agitação mediante a excitação de um potencial de onda triangular. Nesta técnica, o potencial varia inicialmente de forma linear, até que a varredura é invertida e o potencial volta ao seu valor inicial, fechando um ciclo. A Figura 31 mostra um exemplo em que o potencial inicial parte de +0,8V até -0,15V, daí é invertida a direção de varredura, até atingir o potencial inicial de +0,8V [44].



**Figura 31:** Sinal de excitação de voltametria cíclica usado para obter o voltamograma.

Fonte: [SKOOG , D. A. Princípios de análise instrumental 5 ed. 2002 836p.

## **4.5.2 Caracterização óptica**

### **4.5.2.1 Microscopia óptica (MO)**

Esta técnica visa à caracterização e inspeção de superfícies, neste caso, superfície metálica. Em metalografia, a microscopia óptica é utilizada na revelação de padrões e estruturas de ligas metálicas, bem como pode avaliar a resistência do metal em um meio agressivo, isto porque as imagens microscópicas registradas podem ter vários aumentos, por exemplo, 50 a 500 vezes [57].

### **4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Detalhar a natureza física das superfícies sólidas é essencial para o avanço de pesquisas nos mais variados campos de estudo (Química Engenharia de Materiais, Geologia e Biologia). O método clássico para se obter informação é por meio de microscopia óptica, porém, a resolução é limitada por efeitos de difração, ordem de grandeza e comprimento de onda da luz [44].

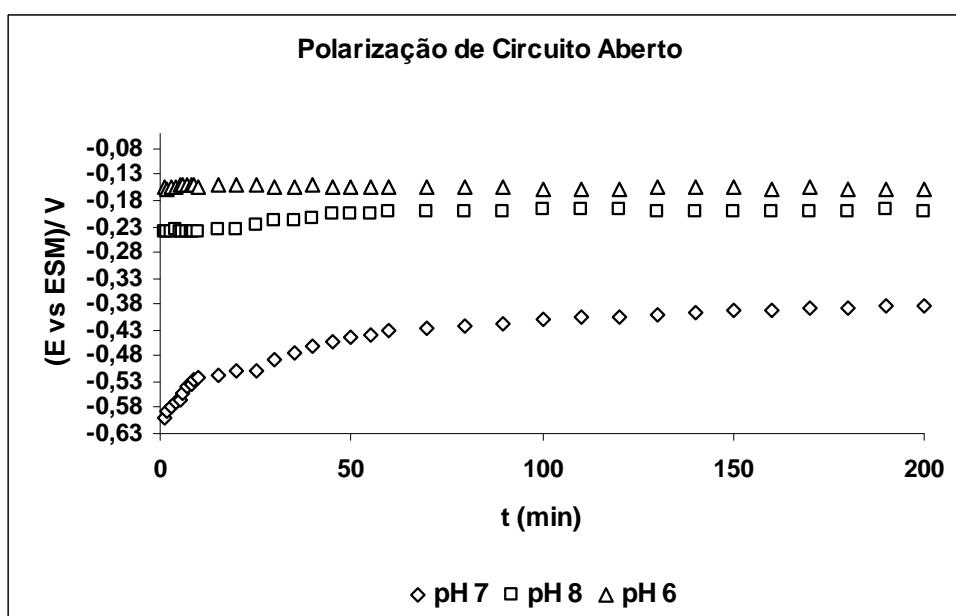
Atualmente, as informações sobre superfícies com uma resolução consideravelmente melhor são obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), que tem uma elevada resolução na ordem de 2 a 5nm e, além disso, a elevada profundidade de foco para obter imagem com aparência tridimensional e a capacidade de combinar a análise macroestrutural com a microanálise química são vantagens primordiais para o amplo uso desta técnica.

Esta técnica pode fornecer informações detalhadas de um sólido com um aumento de até 300.000 vezes e, assim, através das imagens obtidas pelo MEV, é possível analisar a microestrutura com seus mínimos defeitos tais como trincas, corrosões, descolamento e filmes superficiais de espessura menores que 1 $\mu$ m.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Potencial de circuito aberto (PCA)

Os potenciais de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) do aço AISI 316 foram medidos em circuito aberto em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem a presença da *E. coli*, e em três concentrações de *E. coli* 0,1% ;1% e 10% nos valores de pH 6; 7 e 8. Os potenciais de corrosão do aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , com 10% de *E. coli*, nos pH 6; 7 e 8 estão apresentados na Figura 32.



**Figura 32:** Curvas do potencial de circuito aberto para se obter o potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) do aço AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.

Mediante o gráfico da Figura 32, observa-se que o potencial de corrosão se mantém estável a partir de 50 minutos, ou seja, a velocidade da reação de oxidação é igual à velocidade da reação de redução, o que caracteriza a estabilidade do potencial de corrosão do aço 316 no meio com *E. coli*. A bactéria cria um biofilme sobre a superfície do metal, o que não interfere no equilíbrio das reações de redução e oxidação do aço com o meio.

Na tabela 5 estão apresentados os potenciais de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) para o aço 316 em três concentrações de *E. coli* e no branco em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com três valores de pH: pH 6, pH 7 e pH 8.

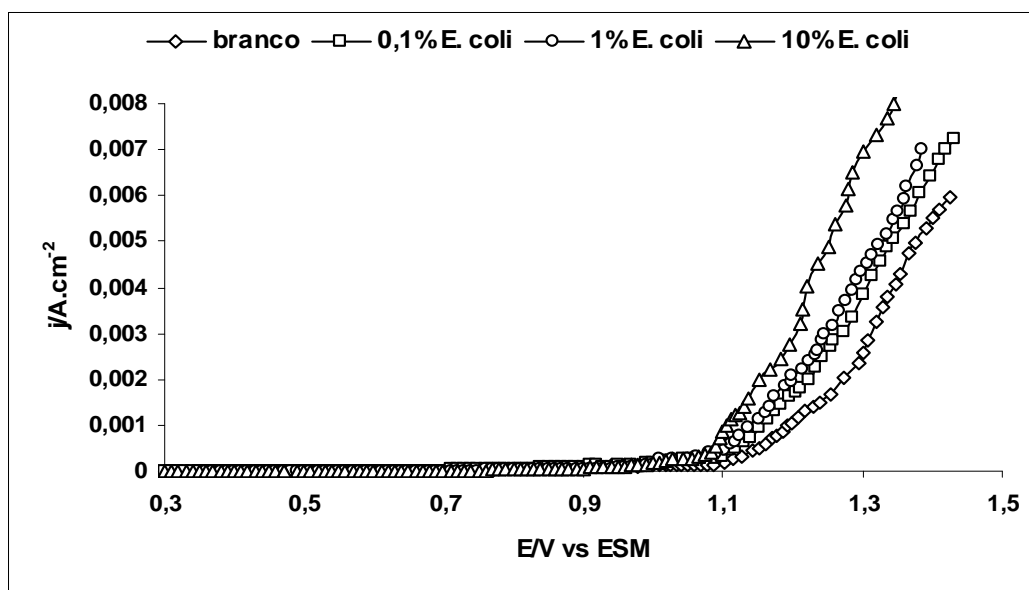
**Tabela 5:** Potenciais de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ), para o aço AISI 316, na presença de *E. coli* em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  nos valores de pH 6, pH 7 e pH 8.

$E_{\text{corr}} / \text{mV vs. ESM}$	Branco	0,1% (EC)	1% (EC)	10% (EC)
pH 6	$-0,155 \pm 0,005$	$-0,162 \pm 0,004$	$-0,158 \pm 0,005$	$-0,160 \pm 0,005$
pH 7	$-0,380 \pm 0,002$	$-0,389 \pm 0,005$	$-0,389 \pm 0,015$	$-0,388 \pm 0,010$
pH 8	$-0,241 \pm 0,008$	$-0,233 \pm 0,005$	$-0,291 \pm 0,008$	$-0,200 \pm 0,008$

Os valores dos potenciais de corrosão observados nas três concentrações de bactéria para os três valores de pH, da tabela 5 demonstram que, o aumento da concentração de bactéria no meio circundante não altera significativamente o potencial de corrosão (vide valores nas linhas horizontais), comparando-o com o meio isento de bactéria (branco), com exceção as medidas do pH=8. Todavia nota-se que há uma diferença nos potenciais de corrosão variando o pH do meio (vide valores nas linhas verticais).

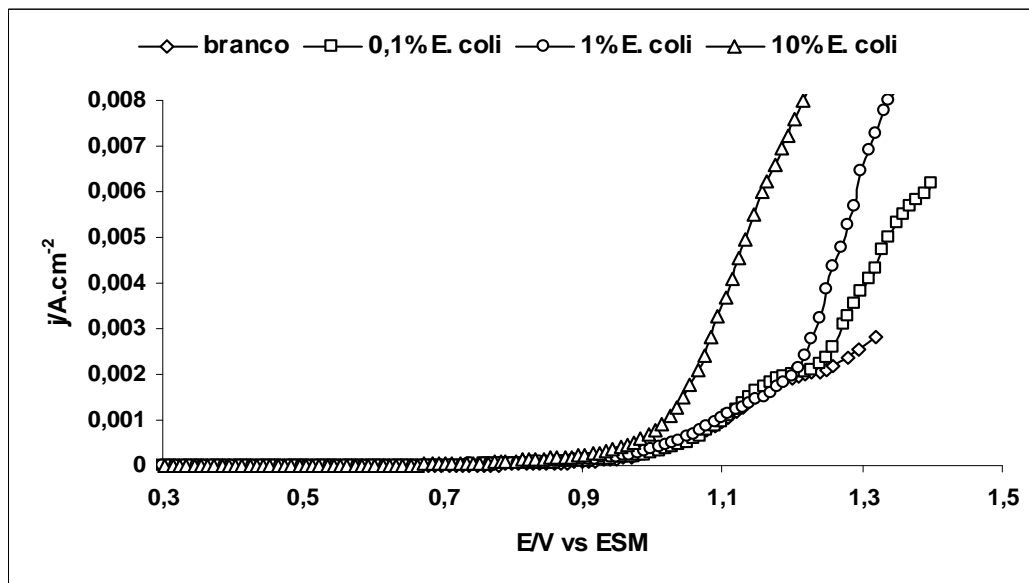
## 5.2 Polarização anódica potenciodinâmica (PAP)

Nas Figuras de 33a até 33c, são apresentadas as curvas de polarização anódica potenciodinâmica em meio de ( $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), variando as concentrações de *E. coli* em 0,1; 1 e 10% nos valores de pH 6; 7 e 8 para o aço AISI 316.



**Figura 33a:** Curvas de polarização anódica potenciodinâmica para o aço 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , v.v:  $1\text{mVs}^{-1}$  variando as concentrações de *E. coli* no pH 6.

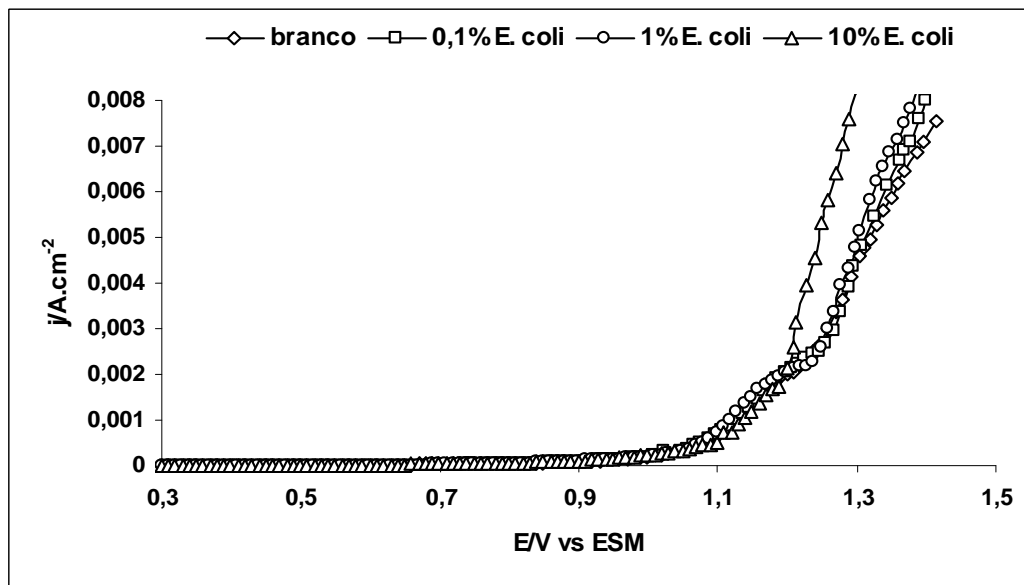
Verificou-se na Figura 33a que nos resultados em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 6, o aço AISI 316 é passivo até um E de  $\approx 1,05\text{V/ESM}$ . Neste pH notou-se que há uma polarização. Além disso, notou-se que na região transpassiva, houve um aumento na densidade de corrente comparando o meio com 10% de *E. coli* com as concentrações de 1% e 0,1% e o branco a partir de um potencial  $E \approx 1,10\text{V}$ .



**Figura 33b:** Curvas de polarização anódica potenciodinâmica para o aço 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , v.v : $1\text{mVs}^{-1}$  variando as concentrações de *E. coli* no pH 7.

No gráfico da Figura 33b em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 7, os resultados obtidos na polarização revelaram que o aço AISI 316 é passivo até um E de  $\approx 0,95\text{V/ESM}$ . Verificou-se que na região transpassiva a solução com 0,1% de *E. coli* minimizou a densidade de corrente, devido à formação do biofilme porém, a partir de um potencial E de  $\approx 1,25\text{V}$  a densidade de corrente aumentou. Quando se aumenta a concentração de *E. coli* para 1%, observa-se que a densidade de corrente aumenta a partir de um E =  $1,20\text{V}$ . Para a solução com 10% de *E. coli* há uma aumento significativo na densidade de corrente e o potencial anódico diminui para E =  $1,00\text{V}$ . A princípio, a formação do biofilme minimiza a densidade de corrente, mas quando ocorre o descolamento deste da superfície do aço, verifica-se que a liga fica susceptível à corrosão, devido ao aumento brusco na densidade de corrente do sistema estudado. Observou-se que, com aumento da concentração de *E. coli* na solução, a densidade de corrente aumenta em potenciais menores.





**Figura 33c:** Curvas de polarização anódica potenciodinâmica para o aço 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , v.v : $1\text{mVs}^{-1}$  variando as concentrações de *E. coli* no pH 8.

A Figura 33c no meio com pH 8, revelou que o aço AISI 316 é passivo em até  $1,00\text{V/ESM}$ . O pH levemente alcalino minimiza a ação metabólica da bactéria ocasionando no aumento do potencial anódico, comparado com o meio em pH 6 e pH 7 porém, o mecanismo de oxidação do metal é semelhante nos três pH estudados.

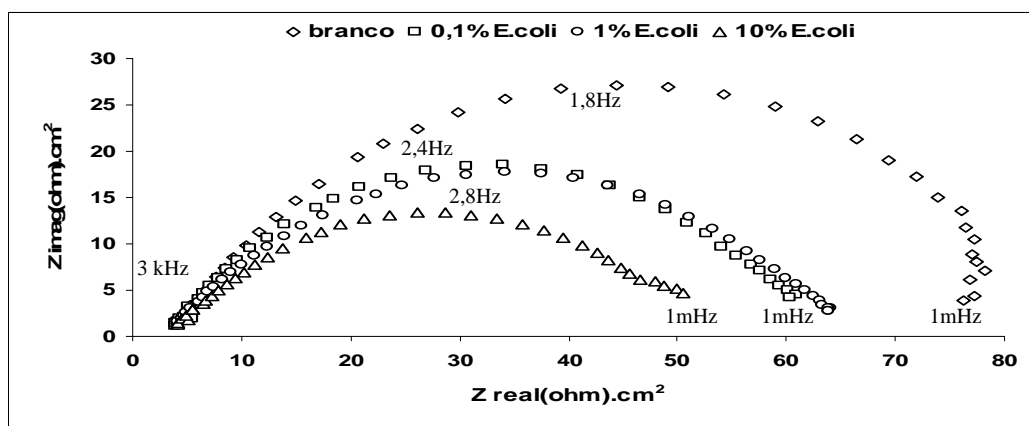
A alcalinidade da solução rompe a parede celular da *E. coli* fazendo com que libere o DNA da bactéria. Isto explica o aumento na densidade de corrente para a solução com 10% de *E. coli* a partir do potencial anódico transpassivo  $E = 1,20\text{V}$ , que é maior do que os outros potenciais observados para o pH 6 de  $1,1\text{V}$  e pH 7  $1,0\text{V}$ .

Em todos os valores de pH estudados, as curvas de polarização mostraram que na solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* há um aumento significativo na densidade de corrente, comparando-a com a solução sem bactéria (branco) e com as concentrações de 0,1 e 1% de *E. coli*. Observou-se também que, nas soluções com 10% de *E. coli* o aumento na densidade de corrente ocorre em potenciais menores em relação a solução sem a bactéria (branco) e as concentrações de 0,1 e 1% de *E. coli*. Isto demonstra que em uma solução com maior concentração de *E. coli* o biofilme tem sua cinética de formação mais rápida e o descolamento deste ocorre proporcionalmente, é por isso que a solução com 10% de bactéria tem um aumento na densidade de corrente em potenciais menores. O descolamento do biofilme ocorre de maneira aleatória e desuniforme, intensificando o processo corrosivo por

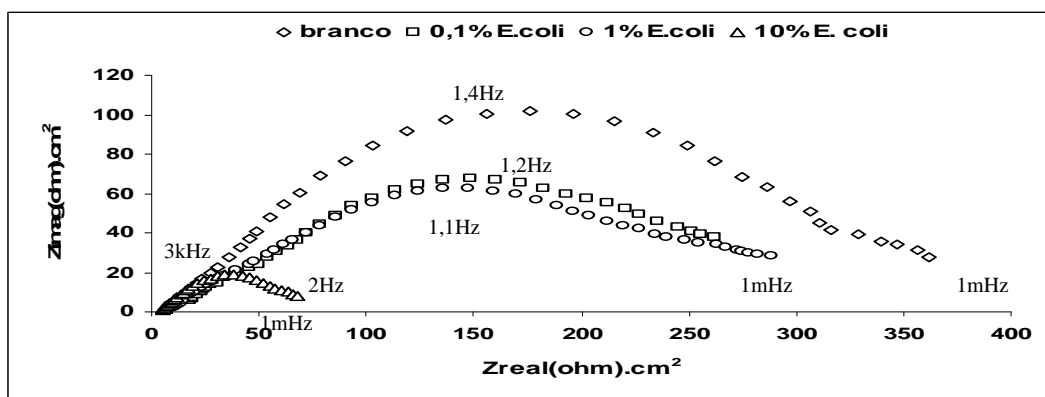
gerar micropilhas de aeração diferencial, uma vez que ainda há regiões da superfície da amostra cobertas pelo biofilme e outras não, resultando no aumento brusco da densidade de corrente nas curvas de polarização.

### 5.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

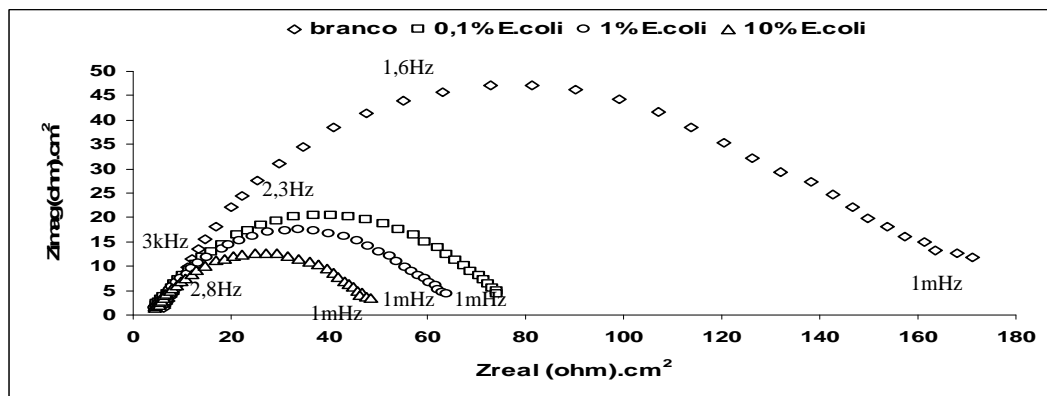
Nas Figuras de 34a até 34c são mostrados os diagramas de impedância eletroquímica (IE)-Nyquist para o AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de *E. coli* a 0,1; 1;10% e no branco e em valores de pH 6; 7 e 8.



**Figura 34a:** Diagrama de (IE)-Nyquist pra o aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\eta = 1 \text{ mV}$  em relação ao  $E_{\text{corr}}$  vs ESM em pH 6.



**Figura 34b:** Diagrama de (IE)-Nyquist pra o aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\eta = 1 \text{ mV}$  em relação ao  $E_{\text{corr}}$  vs ESM em pH 7.



**Figura 34c:** Diagrama de (IE)-Nyquist para o aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\eta = 1 \text{ mV}$  em relação ao  $E_{\text{corr}}$  vs ESM em pH 8.

Observa-se nos diagramas de (IE)-Nyquist das Figuras 34a até a 34c que a resistência de polarização ( $R_p$ ) do aço 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  diminui conforme aumenta a concentração da bactéria no meio circundante, independente do pH, sugerindo que a oxidação do metal aumenta com o aumento da concentração de microorganismo no meio estudado. Os resultados das medidas de  $R_p$  são melhor visualizados na Tabela 6:

**Tabela 6:** Resultados observados nos Diagramas de (IE)-Nyquist de Resistência à polarização ( $R_p$ ) do aço AISI 316 na presença de *E. coli* em concentrações de zero (branco), 0,1; 1 e 10% em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  nos pH 6; 7 e 8.

( $R_p$ )	Branco	0,1% de <i>E. coli</i>	1% de <i>E. coli</i>	10% <i>E. coli</i>
( $\Omega\text{cm}^2$ ) em pH 6	76	64	61	52
( $\Omega\text{cm}^2$ ) em pH 7	360	290	260	60
( $\Omega\text{cm}^2$ ) em pH 8	175	70	60	50

Os resultados de  $R_p$  obtidos pelos diagramas de (IE)-Nyquist e apresentados na tabela 6 confirmam que a resistência de polarização do aço AISI 316 em relação ao meio oxidante diminui quando se aumenta a concentração de *E. coli* nos pH 6, 7 e 8.

Outra importante constatação é de que a  $R_p$  para o pH= 6 e 8, na ausência de *E. coli*, são menores do que o registrado para o pH 7, confirmando que em pH=7 (neutro) a oxidação é menos intensa. Quando se adiciona *E. coli* ao sistema estudado o comportamento continua praticamente o mesmo até 1% de *E. coli*, mas para 10 % de *E. coli* não existe diferença

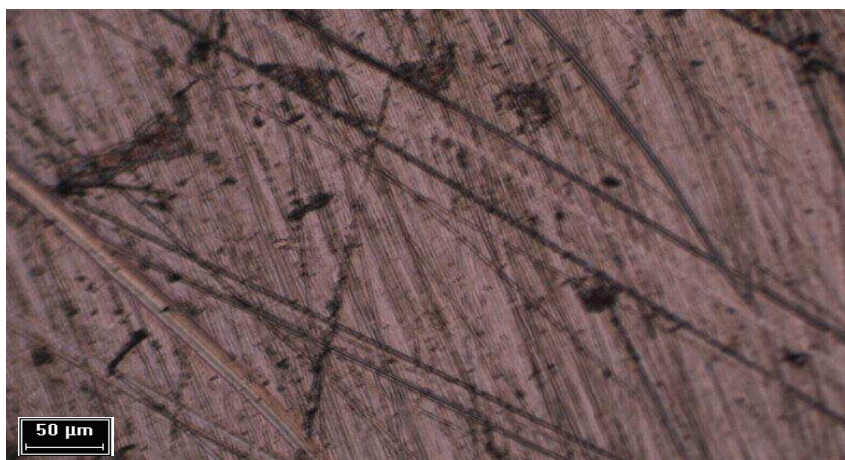
significativa mostrando que este teor de microorganismo acelera o processo corrosivo do metal, independente do pH do meio.

#### 5.4 Microscopia óptica

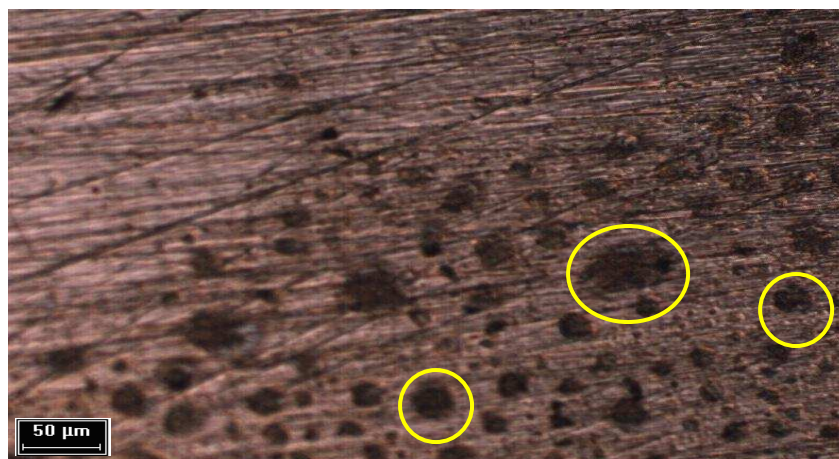
As micrografias apresentadas nas Figuras 35a até a 35e com aumento de 100 vezes, mostram a formação do biofilme após 12 horas de imersão das amostras de aço 316 em soluções de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem a bactéria e com 0,1%, 1% e 10% de *E. coli* em pH 6 mantidas a uma temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . A partir de 12 horas de imersão das amostras é que melhor percebeu-se as alterações causadas pela formação do biofilme sobre a superfície do aço.



**Figura 35a:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem *E. coli*.



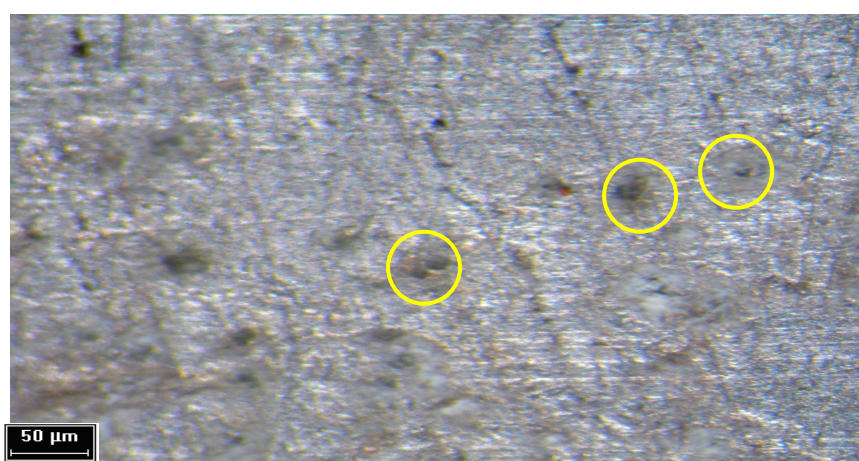
**Figura 35b:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli*.



**Figura 35c:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 1% de *E. coli*.



**Figura 35d:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.



**Figura 35e:** Aço 316 que teve o biofilme removido por polarização anódica após 48 horas de imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.

Como se observa na micrografia da Figura 35b, a microscopia óptica não mostra suficientemente a formação do biofilme sobre a superfície da amostra de aço AISI 316 que foi imersa por um período de 12 horas na solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli* em pH 6. Não há diferença nítida entre a micrografia da Figura 35a (branco) em relação à micrografia da Figura 35b.

Na Figura 35c é apresentada a micrografia da amostra de aço AISI 316 que foi imersa em uma solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  contendo 1% de *E. coli* em pH 6. Nesta concentração, é possível notar a formação de núcleos de biofilmes após 12 horas de imersão da amostra na solução com maior concentração de microorganismo.

Mediante a Figura 35d observou-se a micrografia de uma amostra de aço AISI 316 que foi imersa por um período de 12 horas na solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* em pH 6. Nesta micrografia está evidente que o biofilme cobriu a maioria da superfície da amostra de aço. Portanto o aumento gradativo da concentração de *E. coli* demonstrou que a velocidade de formação do biofilme depende da concentração de microorganismos presentes no meio estudado.

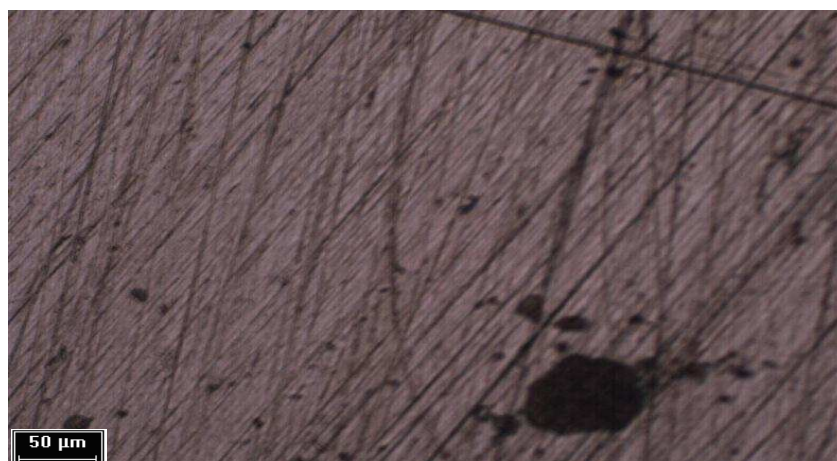
A micrografia da Figura 35e deu-se após 48 horas de imersão da amostra de aço AISI 316 em meio com 10% de *E. coli* e remoção do biofilme por polarização anódica potenciodinâmica. Observou-se nesta micrografia pontos característicos de corrosão localizada, justamente em regiões que foram cobertas pelo biofilme.

As micrografias apresentadas nas Figuras 36a até a 36e com aumento de 100 vezes, mostram a formação do biofilme após 12 horas de imersão das amostras de aço 316 em soluções de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem a bactéria e com 0,1%, 1% e 10% de *E. coli* em pH 7.

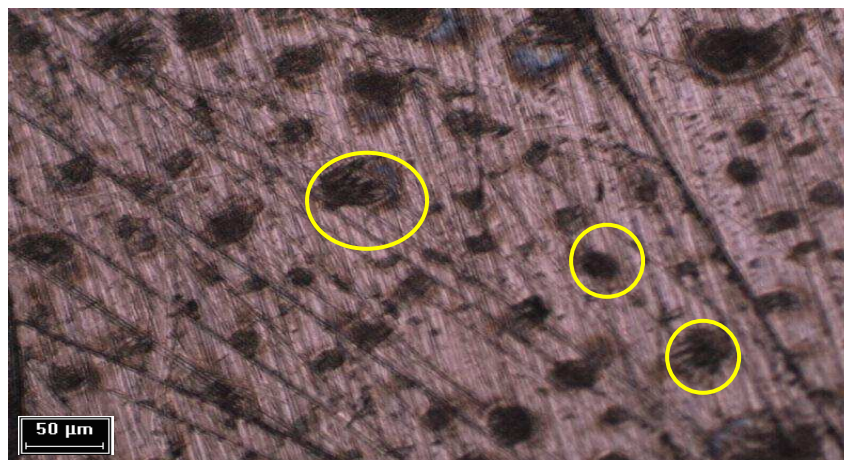
Com 12 horas de imersão das amostras nas soluções com *E. coli* é que pode-se melhor perceber por meio da microscopia óptica as alterações causadas pela formação do biofilme sobre a superfície do aço.



**Figura 36a:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem *E. coli*.



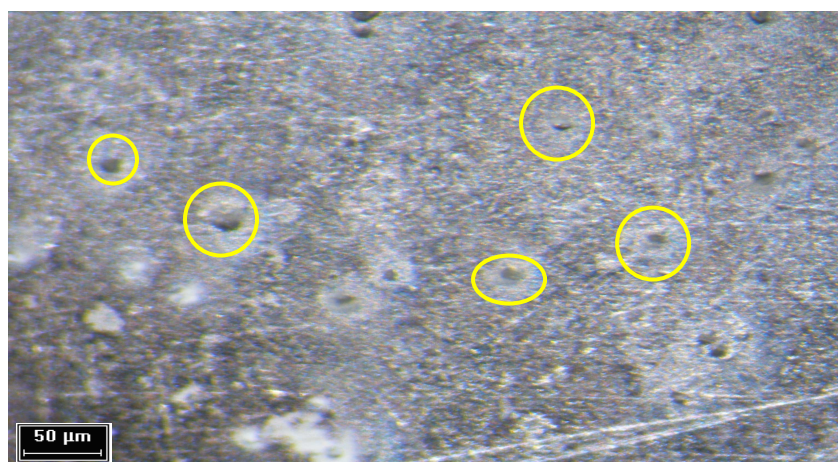
**Figura 36b:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli*.



**Figura 36c:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 1% de *E. coli*.



**Figura 36d:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.



**Figura 36e:** Aço 316 que teve o biofilme removido por polarização anódica após 48 horas de imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.

Na micrografia 36b não é possível notar a formação de biofilme na superfície do aço após 12 horas de imersão na solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli* em pH 7, comparando-a com a Figura 36a que é amostra de aço estava imersa em uma solução sem a bactéria.

Na Figura 36c observa-se vários pontos da superfície do aço onde se formaram núcleos de biofilme após 12 horas de imersão em uma solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 1% de *E. coli* em pH 7. É nítida a diferença ao comparar-se com a amostra imersa no branco (Figura 36a) e com a amostra que foi imersa na solução com 0,1% de bactéria (Figura 36b).

Na Figura 36d observa-se que o biofilme está aderido sobre uma grande área da superfície da amostra, que foi imersa durante 12 horas em uma solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$



com 10% de *E. coli* em pH 7. Isto se caracteriza pela formação do filme escurecido sobre a superfície do metal. Tal diferença fica evidente quando comparamos a micrografia da Figura 36d com as micrografias das Figuras 36 (a), (b) e (c). Portanto, a cinética de formação de um biofilme depende da concentração de bactérias no meio oxidante.

A Figura 36e mostra a micrografia da amostra de aço 316, após 48 horas de imersão em meio com 10% de *E. coli* no pH 7. O biofilme foi removido da amostra por polarização anódica potenciodinâmica e seguidamente a amostra foi micrografada.

O que se observou na amostra após a remoção do biofilme foram pontos característicos de corrosão, (vide Figura 36e), comparando-se com a Figura 36a, que é a superfície do aço ainda limpa sem nenhuma formação de biofilme.

O mecanismo de corrosão influenciado pela *E. coli* ocorre quando a área do aço ao qual o biofilme fica aderido torna-se pouco oxigenada e isto compromete a formação da camada oxido protetora na superfície do aço. Desta forma a liga perde a propriedade auto-passivante, o que a torna vulnerável a corrosão e, por conseguinte, os processos biológicos que ocorrem no interior do biofilme e eletroquímicos que ocorrem na interface deste com o metal dão origem à corrosão por aeração diferencial.

As micrografias apresentadas nas Figuras 37a até a 37e com aumento de 100 vezes mostram a formação do biofilme após 12 horas de imersão das amostras de aço 316 em soluções de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem a bactéria e com 0,1%, 1% e 10% de *E. coli* em pH 8.

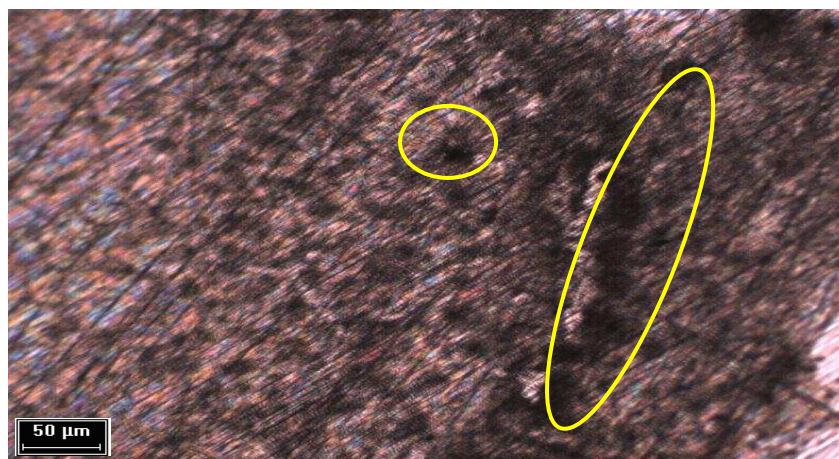
Somente a partir de 12 horas de imersão das amostras de aço no meio com a *E. coli* foi possível perceber a formação de biofilme na superfície do aço AISI 316.



**Figura 37a:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sem *E. coli*.



**Figura 37b:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli*.



**Figura 37c:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 1% de *E. coli*.



**Figura 37d:** Aço 316 após imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.



**Figura 37e:** Aço 316 que teve o biofilme removido por polarização anódica após 48 horas de imersão em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*.

A Figura 37b mostra a micrografia da amostra de aço AISI 316 que foi imersa por 12 horas em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 0,1% de *E. coli* em pH 8. Na concentração de 0,1% de *E. coli* e no tempo de imersão de 12 horas, a formação do biofilme ficou imperceptível na microscopia óptica. Não há diferença significativa quando se compara à amostra micrografada da Figura 37b com a Figura 37<sup>a</sup>, que é a amostra de aço imersa na solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 8 isenta de bactéria.

A micrografia da Figura 37c é uma amostra de aço AISI 316 que foi imersa em meio com 1% de *E. coli* em pH 8 no período de 12 horas. Para este meio com o microorganismo mais concentrado, observou-se a formação de núcleos de biofilme na superfície da amostra.

Na Figura 37d é mostrado a micrografia da amostra de aço AISI 316 que foi imersa por 12 horas em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* em pH 8. Observou-se a formação de um biofilme cobrindo uma grande área da superfície desta amostra. Isto é evidente ao comparar a micrografia da Figura 37d com as demais micrografias (Figuras 37a, 37b, e 37c). Portanto, o biofilme é formado mais rapidamente quando há uma maior concentração de *E. coli* no meio.

Após 48 horas fez-se a polarização anódica potenciodinâmica da amostra de aço que foi imersa no meio com 10% de *E. coli* a fim de remover o biofilme. Tendo a amostra com o biofilme removido, esta foi seguidamente micrografada, vide Figura 37e.

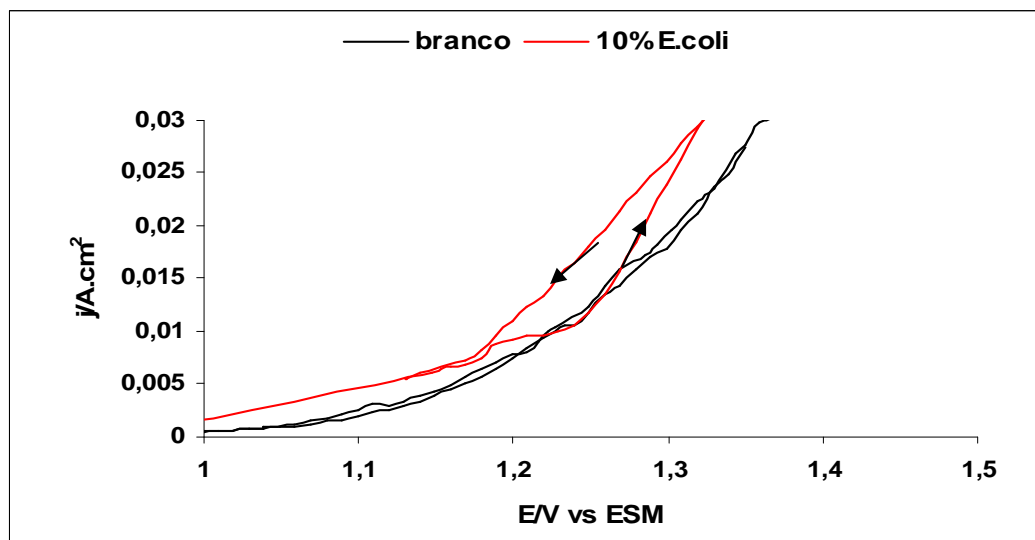
Observou-se na micrografia da Figura 37e pontos de corrosão, provavelmente uma corrosão localizada na superfície da amostra de aço AISI 316. Esta corrosão é oriunda da ação da bactéria *E. coli* presente no meio.

Notou-se em todas as micrografias apresentadas que a variação do pH 7 para levemente ácido (pH 6), levemente alcalino (pH 8), não interferiu a ação da *E. coli* em formar o biofilme sobre a superfície das amostras de aço AISI 316. O meio com 10% de *E. coli* apresentou a formação de biofilme mais acentuada. Observou-se também, quão mais rápido é a formação do biofilme, mais rápido procede a corrosão do aço, ou seja, quanto maior for a concentração de microorganismos presentes no meio menor será a vida útil do aço AISI 316.

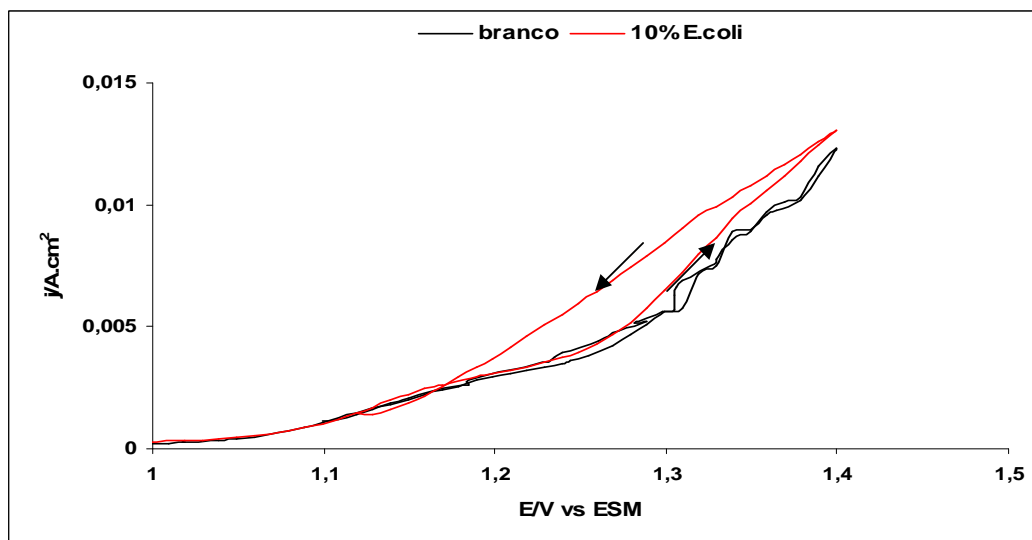
### 5.5 Voltametria cíclica (VC)

Conforme o que se verificou nas micrografias, levantou-se voltamogramas cíclicos para o eletrodo de aço AISI 316 em soluções de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*, e o branco (sem *E. coli*) com o objetivo de elucidar se a corrosão observada nas micrografias era ou não localizada.

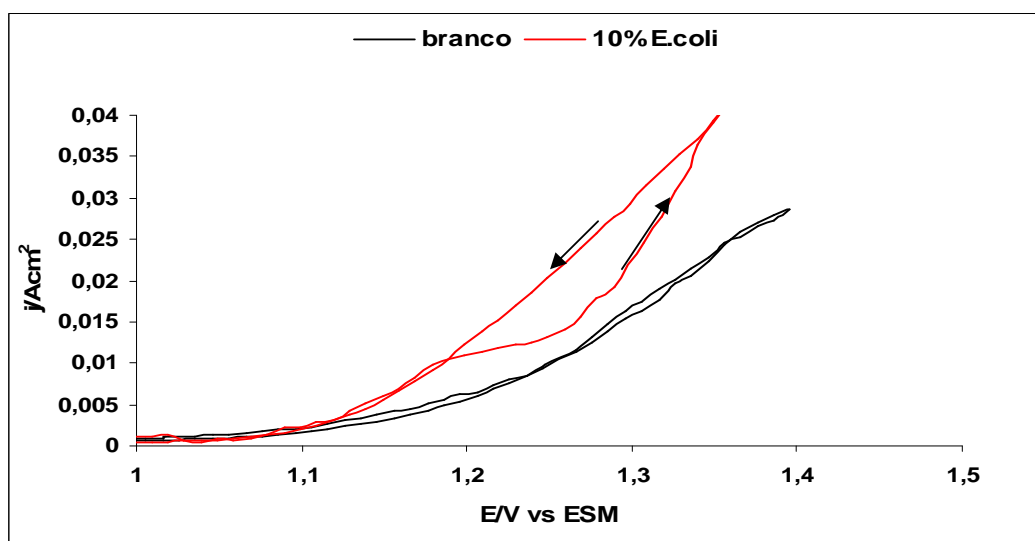
Nas Figuras 38a até 38c, são mostrados os voltamogramas cíclicos da região transpassiva para o aço AISI 316 em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* e sem a presença de *E. coli* nos valores de pH 6; 7 e 8.



**Figura 38a:** Voltamograma cíclico do aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* e sem *E. coli* (branco) em pH 6. Eletrodo de Referência de sulfato mercurioso (ESM). Velocidade de varredura  $1 \text{ mVs}^{-1}$ .



**Figura 38b:** Voltamograma cíclico do aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* e sem *E. coli* (branco) em pH 7. Eletrodo de Referência de sulfato mercurioso (ESM). Velocidade de varredura  $1 \text{ mVs}^{-1}$ .



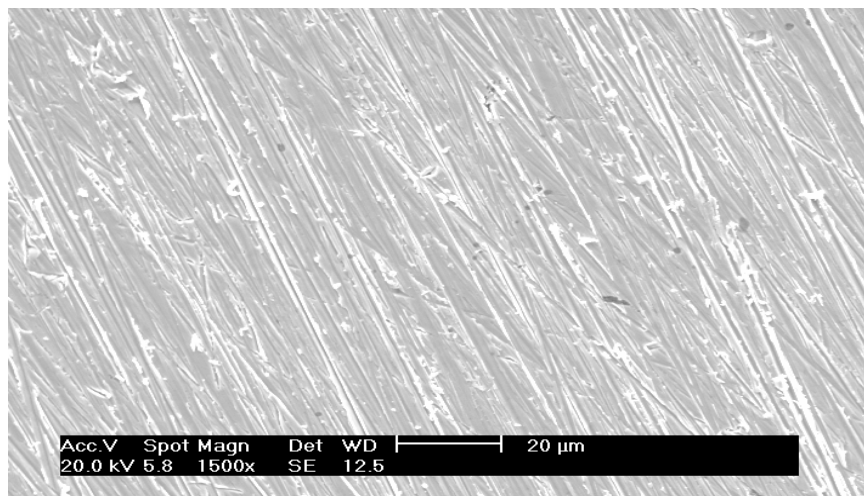
**Figura 38c:** Voltamograma cíclico do aço AISI 316 em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* e sem *E. coli* (branco) em pH 8. Eletrodo de Referência de sulfato mercurioso (ESM). Velocidade de varredura  $1 \text{ mVs}^{-1}$ .

Nos voltamogramas cíclicos das Figuras 38a, (b) e (c), notou-se que nas soluções livres da presença de *E. coli* (branco) não registrou-se uma histerese significativa, ou seja, não teve mudança na área do eletrodo exposto ao meio oxidante. Porém, quando comparado aos voltamogramas obtidos nas soluções com 10% de *E. coli*, é evidente a histerese, indicando

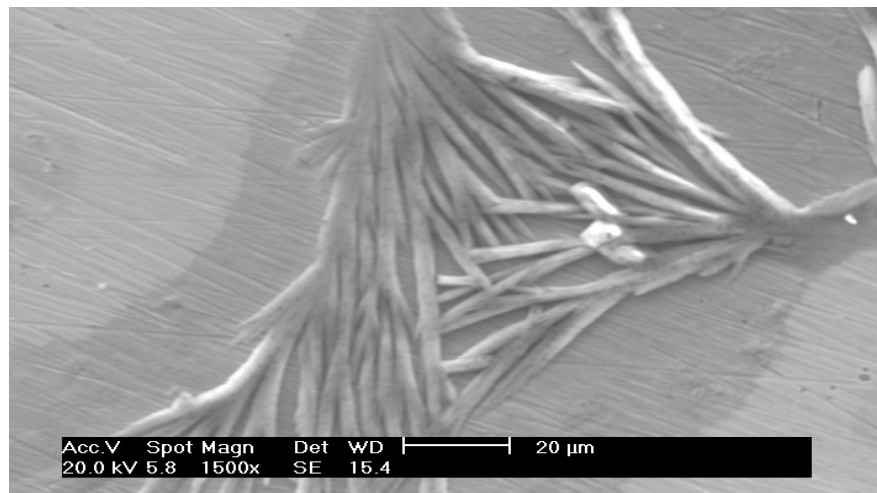
uma alteração na área do eletrodo de trabalho (aço AISI 316) portanto, houve corrosão localizada na superfície do metal. A voltametria cíclica comprovou o que verificou-se nas micrografias, uma vez que o aumento da área no ciclo do voltamograma caracteriza corrosão.

### 5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

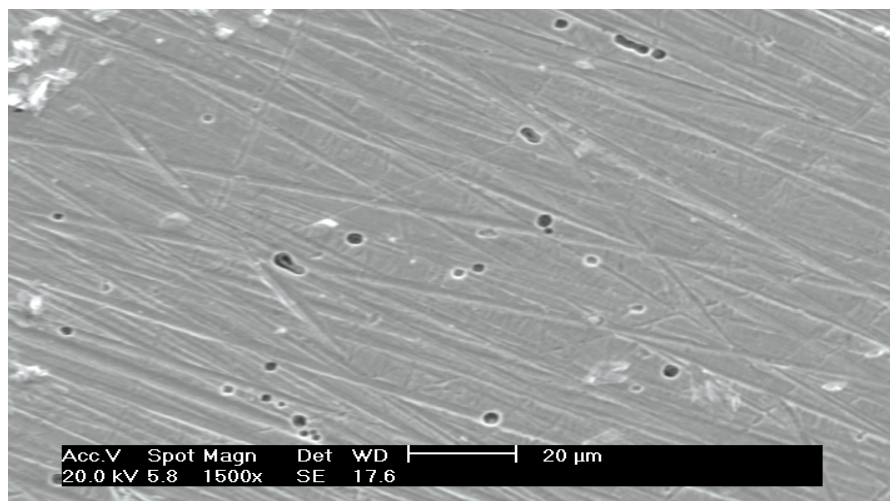
Nas Figuras 39a até a 39c são apresentadas as micrografias feitas através do MEV para as três amostras de aço AISI 316.



(a)



(b)



(c)

**Figura 39:** Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1500 vezes para o: (a) substrato de aço AISI 316 polido; (b) substrato de aço AISI 316 após imersão por um período de 24 horas em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli* (c) substrato de aço AISI 316 após remoção do biofilme via polarização anódica potenciodinâmica.

Na Figura 39a é mostrada a superfície do aço AISI 316 somente polida. Nesta micrografia é possível notar as ranhuras causadas pelo polimento da peça metálica. Na Figura 39b, é observada a superfície do metal após imersão durante 24 horas em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 10% de *E. coli*. Verifica-se que, além das ranhuras do polimento, há a presença de camadas de biofilme formadas sobre a superfície do substrato metálico. Este biofilme tem a forma de paliçadas, um arranjo típico observado para colônias de *E. coli*.

Na microscopia da Figura 39c, observa-se na superfície do aço AISI 316 após a remoção do biofilme via polarização anódica, a existência de corrosão localizada do tipo pite, provavelmente devido aos biofilmes gerados sobre a superfície do metal.

A microscopia eletrônica de varredura elucidou o tipo de corrosão que o aço AISI 316 sofre frente à bactéria *E. coli*, uma vez que a microscopia óptica não mostrou com clareza os pites de corrosão. Porém, confirmou-se que a superfície do aço sofreu corrosão localizada por meio de voltametria cíclica, já que as histereses observadas nos voltamogramas cíclicos para o sistema com 10% de *E. coli* nos três valores de pH demonstraram que estava ocorrendo uma variação na área do eletrodo de trabalho (aço AISI 316), sendo que esta variação indica corrosão na superfície do eletrodo de trabalho.

Os resultados obtidos nas curvas de polarização anódica potenciodinâmica mostraram que a densidade de corrente aumenta significativamente com o aumento da concentração de *E. coli* no meio estudado, revelando que a bactéria catalisa a reação de oxidação do aço AISI 316. Um comportamento semelhante pode ser observado para as impedâncias eletroquímicas, pois os diagramas de Nyquist levantados para os três valores de pH estudados mostraram que a resistência à polarização ( $R_p$ ) do aço AISI 316 diminui com o aumento da concentração de *E. coli* no meio.



## 6 CONCLUSÕES

(1) O aumento da concentração de *E. coli* no sistema estudado pode provocar o deslocamento do biofilme, acentuando a corrosão do aço AISI316 em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>.

(2) Em todos os sistemas estudados caracterizou-se a existência da corrosão localizada, oriunda provavelmente do mecanismo de aeração diferencial na superfície do aço AISI 316, provocada por regiões sem e com biofilme.

(3) A microscopia eletrônica de varredura confirmou que a presença de *E. coli* induz à corrosão localizada do tipo pites na superfície do aço inoxidável AISI 316.

(4) As curvas de polarização potenciodinâmica indicaram que, embora o mecanismo de dissolução do aço AISI 316 seja semelhante, no pH 7 é menor, aproximadamente 0,95V e com densidades de correntes muito mais altas.

(5) Os diagramas de Nyquist, mostraram que foi possível quantificar os valores de resistência de polarização (R<sub>p</sub>) tanto em relação à variação de pH, bem como em relação a variação na concentração da *E. coli*.

(6) Os resultados obtidos das diferentes técnicas são concordantes entre si.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]-PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, vol. 1, 2 ed. Makron Books, Editora Afiliada ABDR, p. 55-130
- [2]-XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. V. M. **Biomatemática - Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes**. Disponível em: <[http:// dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf](http://dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf)>. Consultado em 30 de set de 2008.
- [3]-VIDELA, H. A. **Corrosão Microbiológica**. São Paulo SP, 1993, 65p.
- [4]-FLEMMING H.C., Introduction: **biofilms as a particular form of microbial Life**: FLEMMING H.C e GEESEY, G. G. eds. **Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems**, Heidelberg, Springer-Verlag, 1991, p.1-7.
- [5]-CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. **Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach**. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (eds.) **Biofilms**. John Wiley e Sons. New York 1990.
- [6]-PONTE, H. A. **Fundamentos da corrosão**. Disponível em: <[http:// www.ufpr.br](http://www.ufpr.br)>. Consultado em 10 out. de 2006.
- [7]-CHAVES, L. C. D. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contato com água potável**. 2004. 156p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente apresentada a Universidade do Minho, Lisboa, Portugal.
- [8]-PIMENTA,G.; PEPE, N. **Microbial influenced Corrosion to AISI 304/306 in Water Conveying Systems**, in Symposium New Trends in Molecular Electrochemistry e XII Meeting of the Portuguese Electroquimical Society, Academia de Ciências, Lisboa,Portugal,2003.

- [9]- SILVA, A. L. C.; MEI, P. R. **Aços e ligas especiais**. 2 ed. Sumaré: Eletrometal S. A. Metais Especiais, 1988. 528p.
- [10]- POURBAIX, M. **Lições de corrosão eletroquímica**. 3 ed 1987
- [11]- MELATO, A. I.; FUNDO, A. M. e ABRANTES L. M. Comportamento de ânodos de aço em meio alcalino. **Corrosão e Proteção de Materiais**, v. 25, n 4, p.108-113, jul. 2006.
- [12]- GENTIL, V. **Corrosão**. 4 ed . Rio de Janeiro: LTC, 1987.
- [13]- RODRIGUES, P. R. P et al, Anais do International Symposium on Electrochemical methods in Corrosion Research –EMCR97, Trento – Itália, 25 a 29 de agosto, (1997).
- [14]- CALLISTER, W. D. **Materials science and Engineering na introduction** 3 ed. 1993.
- [15]- LITTLE, B.; WAGNER, P. Myths related to microbiologically influenced corrosion. **Material Performance**. v. 36, n. 6, p. 40-44, 1997.
- [16]- LITERATURA. **Tipos de corrosão**. Disponível em: <[http://www.iope.com.br/3i\\_corrosao\\_2.htm](http://www.iope.com.br/3i_corrosao_2.htm)>. Acesso em 15 jan. 2009.
- [17]- REVISTA80. **Há relação entre corrosão microbológica e corrosão eletroquímica?** Disponível em: <<http://www.recuperar.com.br/revistas/meuproblema/meuproblema80>>. Acesso em 21 mar. 2009.
- [18]- VIEIRA, A. S. S. **Estudo de microorganismos com potencial à biocorrosão em superfícies metálicas**. Disponível em: <[http://www.cbecimat.com.br/Trab\\_Completos/304-081](http://www.cbecimat.com.br/Trab_Completos/304-081)>. Acesso em 10 Fev. 2009.
- [19]- MACHADO, J. S. P. E. et al. Avaliação da corrosão microbológica no aço inoxidável AISI 444 por microorganismos presentes em amostras de petróleo. **Revista Matéria**, v. 10, n. 2, p. 258-264, 2005.

- [20]- BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C. Recent advances in the study of biocorrosion an overview. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 177-190, 1999.
- [21]- PANNONI, F. D. **Fundamentos da corrosão**. Disponível em: <[http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/control\\_e\\_etapa\\_de\\_pr](http://www.gerdal.com.br/gerdalacominas/upload/produtos/artigostecnicos/control_e_etapa_de_pr)>. Acesso em 15 jan. 2009.
- [22]- COSTA, A. L. B. C. et al. **Avaliação do efeito da rugosidade superficial na corrosão por pites no aço AISI 316 empregando-se técnica eletroquímica e perfilometria**. Disponível em: <[http://www.cebcimat.com.br/Trab\\_Completos/304-061](http://www.cebcimat.com.br/Trab_Completos/304-061)> Acesso em 15 jan. 2009.
- [23]- PEREIRA, M. O. B. O. **Comparação de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 211 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Lisboa, Portugal.
- [24]- GONÇALVES, N. J.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. **Ação de biocida a base de Glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de microorganismos sésseis**. In: 6<sup>o</sup> CONFERENCIA SOBRE TECNOLOGIA DE EQUIPAMENTOS e 22<sup>o</sup> CONGRESSO BRASILEIRO DE CORROSÃO, 2002, Salvador. Bahia.
- [25]- FLEMMING, H. C. Biofilms and environmental protection. **Water Science and Technology**. v. 27, p. 1-10, 1993.
- [26]- WIMPENNEY, J. W. T. et. al. The Physiology and Biochemistry of Biofilm. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. ed. **Structure and Function of Biofilms**. Dahlem Workshop, Jhon Wiley and Sons, 1993. p. 11-127.
- [27]- NIELSEN, P. H.; JAHN, A.; PALMGREN, R. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. **Proceedings** of the 3<sup>rd</sup> International IAWQ Special Conference on Biofilm Systems. Copenhagen, Denmark. 1996.

- [28]- ALMEIDA, M. A. N.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. **Monitoramento da formação de biofilme em torres de refrigeração.** In: 6<sup>o</sup> CONFERENCIA SOBRE TECNOLOGIA DE EQUIPAMENTOS e 22<sup>o</sup> CONGRESSO BRASILEIRO DE CORROSÃO, 2002, Salvador. Bahia.
- [29]- MORAES, J. E. et al. **O efeito do pH na corrosão microbiológica do aço 316 pela *Escherichia coli*.** In: XVI ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL: A Química como Ciência, Educação e Tecnologia, 2008, Blumenau. **Resumo.** Blumenau : FURB, 2008. v. único. p. FQ062-FQ062.
- [30]- STAINER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. I.; PAINTER, P .R. **General Microbiology.** 5 ed. MacMillan Press, London, 1995, p. 207-209.
- [31]- COOK, P. E. e GAYLARDE, C. C., Biofilms formation in aqueous metalworking fluids, **International Biodeterioration**, v. 24, p. 265-270, 1988.
- [32]- SRIVASTAVA, R. B. Interfacial Phenomena in Biocorrosion. **Pure and Appl. Chem.** v. 70, n. 3, p. 627-632, 1998.
- [33]- VERRAN, J.; MARYAN, C. J. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 77, p.535-539, 1997.
- [34]- BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- [35]- YANOP, D. M.; FARRIS, M. G.; UMINO, C. Y.; COUTINHO, H. L. C.; CANHOS, V. P. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias.** Fundação tropical de pesquisa e tecnologia André Tosello, 25 a 29 de out. 1993

- [36]- PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O 157: H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. **Journal of Food Protection**, v. 55, n.7. p. 555-565, 1992.
- [37]- ZHAO, T., DOYLE, M. P. Fate of enter hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 9, p. 780-783, 1994.
- [38]- OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, L. A.;DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products **Food control** v. 19, p. 178-185, 2008.
- [39]- CHENG, G.; ZHANG, Z.; CHEN, S.;BRYERS, J. D. JIANG, J. Y. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces biomaterials, v. 28, p. 4192-4199, 2007.
- [40] STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- [41]- GJALTEMA, A. Biofilm Development: Growth versus Detachment. 1996. 224 p. Tese de Doutorado Delft: Technische Universiteit Delft, Netherlands.
- [42]- HALL, S. L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. **Nature Review**, v. 2, p. 95-108, 2004.
- [43]- KYAW, L. M. Morfologia e ultraestrutura bacteriana-parte 1. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia1/html>>. Acesso em 20 jan. 2009.
- [44]- SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre, 2002 836p.

- [45]- RODRIGUES, P. R. P. **O Benzotriazol como inibidor de corrosão para o ferro e ligas ferrosas em meios de ácido sulfúrico**. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da USP-SP, 1997.
- [46]- ANUNZIATO, P.; TUSSOLINI, M. ; CAPARICA, R. ; FURSTENBERGER, C. B. ; RODRIGUES, P. R. P. . Estudo da influência do *Thiobacillus thiooxidans* na corrosão do aço inoxidável 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1\text{mol L}^{-1}$ . In: INOX, 2008, São Paulo. **IX Seminário Brasileiro do Aço Inoxidável**. São Paulo : Núcleo Inox, 2008. v. único. p. 149-154.
- [47]- TORRES, E. S. **Cinética de Parâmetros Microbiológicos na Formação de Biofilmes** 2001. 80p. Tese de Mestrado apresentada a Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ Escola de Química - EQ.
- [48]- VIOMAR, A.; LIMA, E. S.; CUNHA, M. T.; D'ELIA, E.; RODRIGUES, P. R. P. Estudo do Comportamento Eletroquímico da Cisteína e do Difosfonato para o aço inoxidável 304 em  $\text{HCl}$   $1\text{mol L}^{-1}$ . In: INOX, 2008, São Paulo. **IX Seminário Brasileiro do Aço Inoxidável**. São Paulo : Núcleo Inox, 2008. v. único. p. 134-138.
- [49]- MARQUES, M. S. G. T. C. **Monitorização de Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*** 2004. 156p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente apresentada a Universidade do Minho, Lisboa, Portugal.
- [50]- ALVES, G. J. T. ; MORAES, J. E. ; CAPARICA, R. ; FURSTENBERGER, C. B. ; RODRIGUES, P. R. P. . A ação do *Thiobacillus thiooxidans* na corrosão do aço inoxidável 430 em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1\text{mol L}^{-1}$ . In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau. **XVI Encontro de Química da Região Sul: FURB**, 2008.
- [51]- DA SILVA, R.C.B.; PONTES FILHO, T.R. Corrosão do aço carbono em meio sulfato na presença da bactéria *Salmonella anatum* **Revista Matéria**, v.13, n.2, p. 1-15, 2008.
- [52]- TEIXEIRA, C. M.; RAMIREZ, I.; GARCIA, O. J.; GUSTALDI, A. C.; Aplicação de técnicas eletroquímicas no estudo da dissolução oxidativa da covelita ( $\text{CuS}$ ) por *Thiobacillus ferrooxidans* **Revista Química Nova**, v. 25, n. 1 São Paulo, Jan/Fev. 2002.

- [53] DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Review Microbs and Infections**. V. 5, p. 1231-1219, 2003.
- [54] FLETCHER, M. **Bacterial Metabolism in Biofilms**. In MELO, L. F.; BOTT, T. R.; FLETCHER, M. and CAPDEVILLE, B. Eds. *Biofilms Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 113-124, 1992.
- [55] GANTZER, C. J.; CUNNINGHAM, A. B.; GUJER, W.; GUTEKNUST, B.; et al Exchange processes at the fluid biofilm interface. In Characklis, W>G. **Structure and Function of Biofilms**, p. 73-89, 1989.
- [56] RODRIGUES, P. R. P. **Cinética de fenômenos eletródicos**. Guarapuava: DEQ UNICENTRO 2005. / Notas de aula da disciplina de eletroquímica.
- [57] PADILHA, A. F.; AMBROZIO, F. F. **Técnicas de Análise Micro estrutural**. São Paulo Editora Hemus, 192p. 1985.