EFEITO DO POTENCIAL DE PROTEÇÃO CATÓDICA NA CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA

Mariana Machado Galvão

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências

Orientadora: D.Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo

Co-orientadora: D.Sc. Simone Louise Delarue César Brasil

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Abril, 2008

EFEITO DO POTENCIAL DE PROTEÇÃO CATÓDICA NA CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA

Mariana Machado Galvão

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc. – Orientadora

Simone Louise Delarue César Brasil, D.Sc. – Co-orientadora

Ladimir José de Carvalho, D.Sc.

Márcia Teresa Soares Lutterbach, D.Sc.

Márcia Monteiro Machado Gonçalves, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ
Abril, 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA

Galvão, Mariana Machado.

Efeito do potencial de proteção catódica na corrosão microbiologicamente induzida / Mariana Machado Galvão. – Rio de Janeiro, 2008.

xii, 104 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química – EQ, 2008.
Orientadoras: Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Simone Louise Delarue César Brasil

1. Biocorrosão. 2. Proteção Catódica. 3. Bactérias redutoras de sulfato. I. Sérvulo, Eliana Flávia Camporese (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

Aos meus pais, Marlene e Ruben, que são
a base de tudo e pelos quais nutro uma
imensa admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

- À Profª. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, orientadora e amiga, por toda ajuda, orientação, dedicação, paciência e amizade ao longo desses 5 anos;
- À Profª. Dra. Simone Louise Delarue César Brasil, por sempre ter acreditado na aventura de uma microbiologista pelo mundo da eletroquímica;
- À Lisiane, por toda paciência nas análises de pite, fundamentais a esse trabalho;
- À Marcela e a todos do laboratório de Geotecnia da COPPE/UFRJ pela disponibilização do gerador imprescindível a realização dos ensaios;
- Aos amigos do laboratório E-107 e 109: Ju, Thiago, Kally, Ulrich, Aike e em especial ao Douglas, pelo apoio e momentos de descontração;
- À amiga Rayane, pela amizade e ajuda na realização dos experimentos da primeira etapa desta tese;
- Ao Brian Teplica, por toda paciência e amor;
- À toda minha família, em especial às minhas primas Inês e Adriana e ao meu tio Augusto, pela amizade e incentivo dado;
- Aos novos amigos do INT, em especial à Dra. Márcia Teresa Lutterbach, pela oportunidade dada e pelas folgas concedidas na reta final da tese;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

GALVÃO, Mariana Machado. Efeito do Potencial de Proteção Catódica na Corrosão Microbiologicamente Induzida. Orientadoras: Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Simone Louise Delarue César Brasil. Rio de Janeiro: EQ/UFRJ, 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

A proteção catódica é uma técnica extremamente utilizada como método de prevenção contra a corrosão em estruturas enterradas e submersas. É comum considerar como critério de proteção a aplicação de potencial em valores de, no mínimo, -800 $mV_{Ag/AgCl.}$ Contudo, um valor mais catódico (-950 $mV_{Ag/}$AgCl) é indicado para proteção de estruturas na presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). No entanto, a presença de depósitos de sulfeto em estruturas metálicas submersas sob proteção catódica tem levado cientistas a questionar se esse potencial está realmente protegendo o metal da atividade das BRS. Esse estudo foi realizado para determinar o efeito de diferentes potenciais de proteção catódica (-800 $mV_{Ag/AgCl}$, -900 $mV_{Ag/AgCl}$ e -1000 $mV_{Ag/AgCl}$) na corrosão microbiológica em água do mar. Cupons de aço-carbono AISI 1020, protegidos e não protegidos por corrente impressa, foram expostos à água do mar natural contendo bactérias indígenas, incluindo BRS, por 7 dias. Ao final dos ensaios foram realizadas as quantificações de bactérias heterotróficas, bactérias produtoras de ácido e BRS sésseis bem como a determinação da atividade hidrogenásica. O número de microrganismos aderidos às superfícies protegidas foi inferior ao obtido para os cupons não protegidos. Contudo, a atividade hidrogenásica aumentou com a aplicação de potenciais mais negativos. A análise da morfologia da superfície metálica mostrou maior número de pites e pites mais profundos sob cupons protegidos com potenciais mais negativos, o que sugere elevada atividade microbiana sob baixos potenciais de proteção catódica.

ABSTRACT

GALVÃO, Mariana Machado. Effect of Cathodic Protection Potential on Microbiologically Induced Corrosion. Orientadoras: Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Simone Louise Delarue César Brasil. Rio de Janeiro: EQ/UFRJ, 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Cathodic protection is a technique widely used as a prevention method against corrosion of buried and submerged structures. The application of potentials values below -800 $mV_{Ag/AgCl}$ is commonly considered as protection criterion. However, an even more cathodic value of -900 $mV_{Ag/AgCl}$ is adopted in the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB). Nevertheless, the presence of sulfide-containing deposits on protected steel has led scientists to question if the decreased potential is protecting the metal from SRB activity. This study was performed to determine the effect of different cathodic protection potentials (-800 mV, -900 mV and –1000 mV (Ag/AgCl) on microbial corrosion in seawater. Carbon steel AISI 1020 coupons, both unprotected and protected with impressed current, were exposed to natural seawater containing indigenous bacteria, including sulfate-reducing bacteria, for 7 days. Sessile heterotrophic bacteria, acid-producing bacteria, and SRB quantifications were performed at the end of the essays as well as the determination of hydrogenase activity. The number of microorganisms adhered to the protected steels were lower than to the unprotected ones. However, the hydrogenase activity increased with the application of more cathodic potentials. Analyzes of metal surface morphology revealed a higher number of pits and deeper pits on coupons protected with lower potentials, suggesting a high microbial activity under low cathodic protection potentials.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – Introdução e Objetivos 1

I.1 – INTRODUÇÃO 2

I.2 – OBJETIVOS 4

CAPÍTULO I I – Revisão Bibliográfica 6

II.1 – CORROSÃO 7

II.2 – CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA 8

II.3 – BIOFILME 9

II.4 – MICRORGANISMOS QUE PARTICIPAM DA CMI 13

II.4.1 – Bactérias oxidantes de enxofre 13

II.4.2 – Bactérias redutoras de sulfato 13

II.4.3 – Bactérias produtoras de ácido 15

II.4.4 – Bactérias precipitantes de ferro 16

II.4.5 – Bactérias produtoras de exopolissacarídeos 17

II.4.6 – Fungos 17

II.4.7 – Algas 18

II.5 – MECANISMOS DE BIOCORROSÃO 18

II.5.1 – Produção de metabólicos corrosivos 19

II.5.2 – Consumo de inibidores de corrosão pelo metabolismo microbiano 20

II.5.3 – Destruição de revestimentos protetores 20

II.5.4 – Indução da formação de células de aeração diferencial 20

II.5.5 – Despolarização Catódica 21

II.6 – INCIDÊNCIA PRÁTICA ECONÔMICA DA BIOCORROSÃO 22

II.7 – DETECÇÃO E MONITORAMENTO DA BIOCORROSÃO 24

II.7.1 – Métodos microbiológicos 25

II.7.2 – Análises físico-quimicos 25

II.7.3 – Métodos eletroquímicos 26

II.8 – MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA CMI 28

II.8.1 – Limpeza mecânica 29

II.8.2 – Limpeza química 30

II.8.3 – Revestimentos 30

II.8.4 – Técnicas em desenvolvimento 31

II.9 – PROTEÇÃO CATÓDICA 32

II.9.1 – Método de proteção catódica 33

II.9.2 – Mecanismos da proteção catódica 36

II.9.3 – Critérios da proteção catódica 38

II.9.4 – Aplicações práticas dos sistemas de proteção catódica 39

CAPÍTULO III – Materiais e Métodos 41

III.1 – ENSAIOS PRELIMINARES 42

III.1.1 – Corpos-de-prova 42

III.1.2 – Fluido de processo 43

III.1.3 – Sistema 44

III.1.4 – Microrganismos 45

III.1.5 – Procedimento experimental 45

III.1.5.1 – Quantificação celular 47

III.1.5.2 – Perda de massa / taxa de corrosão 48

III.1.5.3 – Análises eletroquímicas 49

III.2 – ENSAIOS DE PROTEÇÃO CATÓDICA 49

III.2.1 – Corpos-de-prova 49

III.2.2 – Fluido de processo 51

III.2.3 – Sistema 51

III.2.4 – Procedimento experimental 53

III.2.4.1 – Quantificação celular 54

III.2.4.2 – Perda de massa / taxa de corrosão 55

III.2.4.3 – Atividade hidrogenásica 55

III.2.4.4 – Dosagem de exopolissacarídeo (EPS) 55

III.2.4.5 – Avaliação da corrosão por pite 56

CAPÍTULO IV – Resultados e Discussão 57

IV.1 – ENSAIOS PRELIMINARES 58

IV.1.1 – Monitoramento microbiológico 58

IV.1.2 – Perda de massa dos cupons de aço-carbono 63

IV.1.3 – Análises eletroquímicas 67

IV.2 – ENSAIOS DE PROTEÇÃO CATÓDICA 71

CAPÍTULO V – Conclusões e Recomendações 91

V.1 – CONCLUSÕES 92

V.2 – RECOMENDAÇÕES 94

Referências Bibliográficas 95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do processo de corrosão do ferro 7

Figura 2: Modelo de biofilme 10

Figura 3: Imagens de pites formados sobre uma superfície metálica 12

Figura 4: Representação esquemática da cadeia de transferência de elétrons em *Desulfovibrio*, com H_2 como fonte de energia e sulfato como aceptor final de elétrons 15

Figura 5: Esquema da interação entre as bactérias produtoras de ácido e as BRS na biocorrosão 16

Figura 6: Corrosão em duto enterrado 19

Figura 7: Biocorrosão por aeração diferencial 21

Figura 8: Esquema da despolarização catódica 22

Figura 9: Duto contendo eletrodos acoplados para monitoramento eletroquímico 27

Figura 10: Curva de polarização catódica e anódica 28

Figura 11: Sistema de proteção catódica galvânica ou por anodo de sacrifício 34

Figura 12: Sistema de proteção catódica por corrente impressa 36

Figura 13: Diagrama de Pourbaix 38

Figura 14: Corpos-de-prova usados nos ensaios preliminares 43

Figura 15: Célula usada nos ensaios preliminares 44

Figura 16: Corpo-de-prova usado no ensaio de proteção catódica 50

Figura 17: Superfície metálica dos corpos de prova antes do início dos ensaios 50

Figura 18: Sistema utilizado nos ensaios de proteção catódica 52

Figura 19: Célula eletroquímica conectada ao potenciostato e ao computador 53

Figura 20: Colonização da superfície de aço carbono AISI 1020 por BRS 59

Figura 21: Célula de ensaio após 14 dias do experimento com BRS em anaerobiose 60

Figura 22: Variação da população de microrganismos sésseis nos ensaios com associação de BRS e *Pseudomonas* 62

Figura 23: Variação da perda de massa ao longo dos experimentos64

Figura 24: Curvas de polarização para o ensaio conduzido com BRS em anaerobiose 68

Figura 25: Curvas de polarização para o ensaio na presença de BRS e *Pseudomonas* em aerobiose 69

Figura 26: Curvas de polarização para o ensaio na presença de BRS e *Pseudomonas* em anaerobiose 70

Figura 27: Número de microrganismos sésseis nos biofilmes formados sobre aço carbono sem e com aplicação da proteção catódica, em 3 diferentes potenciais 71

Figura 28: Célula de ensaio após 7 dias de experimento 72

Figura 29: Ensaio controle da atividade hidrogenásica realizado com bactéria hidrogenase negativa 74

Figura 30: Atividade hidrogenásica dos biofilmes aderidos aos cupons 75

Figura 31: Evolução de hidrogênio no corpo-de-prova polarizado a -1000 mV 76

Figura 32: Observação microscópica de suspensão do biofilme 77

Figura 33: Densidade de corrente de proteção catódica ao longo do tempo 79

Figura 34: Desprendimento da camada formada sobre cupom polarizado a -1000mV em água do mar estéril 79

Figura 35: Linhas de tendência linear obtidas nos ensaio de proteção catódica ao longo do tempo 80

Figura 36: Perda de massa dos cupons metálicos nos ensaios de proteção catódica 82

Figura 37: Aspecto dos cupons após a decapagem 84

Figura 38: Superfície dos corpos-de-prova sem proteção catódica dos diferentes ensaios realizados 85

Figura 39: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -800 mV 86

Figura 40: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -900 mV 86

Figura 41: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -1000 mV87

Figura 42: Imagens do ataque localizado sobre o cupom protegido88

Figura 43: Imagens de uma das áreas de ataque localizado sobre o cupom protegido a -1000 mV na presença de microrganismos 89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da taxa de corrosão do aço carbono 49

Tabela 2: Análise microbiológica da água do mar utilizada 51

Tabela 3: Taxas de corrosão e classificação do processo corrosivo correspondente para os diferentes ensaios realizados 67

Tabela 4: Concentração do biopolímero nos biofilmes 78

Tabela 5: Taxas de corrosão e classificação do processo corrosivo correspondente para os diferentes ensaios de proteção catódica 83

Tabela 6: Dados da corrosão localizada dos corpos-de-prova protegidos catodicamente na presença de microrganismos 88

CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos

I.1 – INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento industrial, a utilização de instalações metálicas enterradas ou submersas, tais como oleodutos, gasodutos, adutoras, navios, plataformas de petróleo, tanques de armazenamento, dentre muitas outras, tem sido cada vez mais freqüente. Em conseqüência, os problemas de corrosão aumentaram em grandes proporções, impondo o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas para o seu combate e controle.

Quando a corrosão das superfícies metálicas ocorre mediante a participação de microrganismos ela é denominada biocorrosão ou corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Os microrganismos aderem ao metal formando estruturas denominadas biofilmes. Estas películas biológicas modificam drasticamente as condições da interface metal/solução formando uma barreira ao contato entre o metal e o meio líquido circundante. Com isso, a corrosão microbiológica ocorre sobre uma superfície modificada, com características físico-químicas e biológicas muito particulares, que pode-se considerar biologicamente condicionada. Ignorar este fato e interpretar um processo de corrosão microbiológica com os mesmos parâmetros e considerações que um caso de corrosão química pode conduzir a um fracasso total num tratamento e inclusive a um agravamento dos problemas que afetam o sistema em questão.

Dentre os diferentes métodos usados para o controle da corrosão um dos mais empregados é a proteção catódica (PC). Proteger catodicamente uma estrutura significa eliminar, por processo artificial, as áreas anódicas da superfície do metal fazendo com que toda a estrutura adquira comportamento catódico. Como conseqüência, o fluxo de corrente elétrica anodo/catodo deixa de existir e a corrosão é eliminada.

Esse método é especialmente atraente em ambientes marinhos onde a condutividade da água, por conta da sua salinidade, é alta o suficiente para permitir a distribuição uniforme da corrente sobre toda a superfície da estrutura a ser protegida. Atualmente, a maioria dos oleodutos e gasodutos em operação no Brasil são protegidos catodicamente. Igualmente as plataformas de prospecção e produção de petróleo no mar, em operação, além das demais estruturas submersas, são também protegidas catodicamente. Essa técnica é ainda bastante empregada em tanques de armazenamento, navios e píeres de atracação. A maioria das instalações e equipamentos acima citados é construída de aço carbono, um material que por ser relativamente barato e apresentar uma ampla gama de propriedades tem sido extensivamente empregado. Porém, aço carbono apresenta, em geral, baixa resistência à corrosão sendo comumente associado a sistemas de proteção catódica quando utilizado em estruturas enterradas, submersas ou, menos freqüentemente, em estruturas em concreto.

A determinação da corrente de proteção catódica de forma criteriosa é fundamental a fim de se evitar o sub ou o superdimensionamento do sistema. No primeiro caso, a estrutura permaneceria exposta ao processo corrosivo e, no caso de superproteção, além do gasto desnecessário, esta poderia ocasionar o empolamento do revestimento protetor através da liberação de hidrogênio bem como a fragilização da estrutura. A quantidade de corrente aplicada depende, dentre outros fatores, das propriedades eletroquímicas da superfície metálica e do tipo de filme que é formado sobre essa superfície na PC. Esses dois fatores são influenciados pelos microrganismos que estão presentes naturalmente na água do mar.

A economia da proteção catódica depende da quantidade de corrente necessária para polarizar a estrutura. Em geral, considera-se o valor de –800 $mV_{Ag/AgCl}$ para estruturas submersas. No entanto, na presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) tem sido sugerido potencial mínimo de proteção mais negativo (–900 $mV_{Ag/AgCl}$)

(GUEZENNEC, 1994; PINEAU *et al.*, 2003). Alguns autores citam que em ambientes com sulfetos, seria necessária uma corrente maior para proteção catódica; porém, já foram relatados casos onde produtos de corrosão associados a BRS foram encontrados abaixo de incrustações de estruturas polarizadas a -900 mV (ROMERO *et al.*, 2006).

As informações que tratam da interação da proteção catódica e a atividade microbiana são ainda muito limitadas e, geralmente contraditórias. Por isso, considerando a relevância deste estudo, as poucas publicações e que a corrente aplicada aos sistemas para proteção das instalações metálicas varia em função das condições do material e do ambiente, é fundamental avaliar a efetividade do potencial adotado na prevenção da corrosão em função da presença e da quantidade de BRS, microrganismos considerados os principais responsáveis pelo processo de CMI devido à produção de sulfetos, agente extremamente corrosivo. Ademais, há que se determinar também a participação de microrganismos produtores de exopolissacarídeos que contribuem para que as BRS colonizem mais rapidamente as superfícies sólidas.

I.2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de proteção catódica na corrosão microbiológica do aço carbono AISI 1020 através da análise de formação de biofilmes e o ataque decorrente à superfície do metal.

Preliminarmente, foram realizados experimentos para obtenção de dados a fim de que permitissem definir as condições experimentais.

Para tanto o estudo foi dividido em duas etapas:

- Estudo preliminar – realizado com o objetivo de avaliar a ação de BRS e sua associação com cultura de *Pseudomonas aeruginosa* na

corrosão do material metálico em água do mar em condição de aerobiose e anaerobiose, através de curvas de polarização e perda de massa;

• Ensaios de proteção catódica – realizado a fim de se avaliar o efeito da aplicação de diferentes potenciais de proteção catódica na formação de biofilmes através de monitoramento microbiológico e por avaliação de pites.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

II.1 – CORROSÃO

A corrosão é o resultado de alterações indesejáveis ocorridas em materiais, principalmente metálicos, devido à ação química e/ou eletroquímica do meio ambiente, associada ou não a esforços mecânicos (GENTIL, 2003). Na corrosão eletroquímica, os elétrons são cedidos em determinada região e recebidos em outra, aparecendo uma pilha de corrosão (Figura 1). O processo eletroquímico de corrosão pode ser decomposto em três etapas principais:

• processo anódico – passagem dos íons para a solução;

• deslocamento dos elétrons e íons – observa-se a transferência dos elétrons das regiões anódicas para as catódicas pelo circuito metálico e uma difusão de anions e cátions na solução;

• processo catódico – recepção de elétrons, na área catódica, pelos íons ou moléculas existentes na solução.

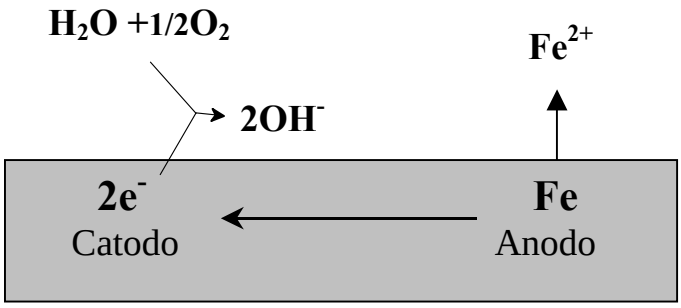


Figura 1: Representação do processo de corrosão do ferro (GENTIL, 2003).

A corrosão é um processo espontâneo que está constantemente transformando os materiais metálicos ou não metálicos de modo que deixam de satisfazer os fins a que se destinam (GENTIL, 2003). Nesse contexto, o processo corrosivo assume uma importância transcendental na vida moderna, que é totalmente dependente da utilização dos metais e suas ligas.

As estruturas metálicas de grande porte como, por exemplo, oleodutos, gasodutos, adutoras, píeres de atracação de embarcações, tanques de armazenamento de combustíveis, plataformas de petróleo, muitas vezes se apresentam enterradas ou submersas onde é maior a probabilidade de ocorrer o processo corrosivo. A maioria dessas instalações representam investimentos de grande monta que, como conseqüência, exigem dos materiais envolvidos durabilidade e resistência à corrosão, que não só justifiquem os valores investidos, mas que impeçam a ocorrência de acidentes que são causa de irreparáveis e incalculáveis danos materiais, ao meio ambiente, e especialmente, aos seres vivos.

II.2 – CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA

A efetiva participação dos microrganismos nos processos de deterioração dos materiais ficou evidente quando teve início a disposição de estruturas metálicas em solos e ambientes aquáticos, onde há presença de uma microbiota diversificada (GONZÁLEZ *et al.*, 1998). Quando a corrosão de um material se processa sob a influência de microrganismos este processo é denominado biocorrosão ou corrosão microbiologicamente induzida (CMI).

A biocorrosão está diretamente relacionada com a aderência de microrganismos na superfície dos materiais e a sua posterior colonização. Estas estruturas microbianas, denominadas de biofilmes ou *biofouling*, são constituídas de agregados celulares, material polimérico extracelular resultante do metabolismo microbiano, matéria orgânica e inorgânica e, principalmente, de água (DAVEY e O'TOLLE, 2000).

Os microrganismos participam de forma ativa na dissolução do metal, mas sem modificar a natureza eletroquímica característica do processo corrosivo (COETSER e CLOETE, 2005). Tem-se assim, um

processo anódico de dissolução metálica e um processo catódico complementar, o qual, dependendo das características do ambiente (pH, oxigênio dissolvido, composição química, etc.), transcorrerá através de algumas reações catódicas possíveis, tais como: redução de oxigênio (em meio aerado e pH aproximadamente neutro) ou redução de hidrogênio (em meio não aerado e pH ácido) (VIDELA, 1996).

Apesar da participação dos microrganismos no processo corrosivo ter sido comprovada no início do século passado, apenas nas últimas duas décadas foi dada a devida importância aos problemas causados pela biocorrosão, o que tem propiciado a interação entre áreas tão díspares como a microbiologia, a eletroquímica e a ciência dos materiais. Além disso, estudos utilizando técnicas mais avançadas como microscopia eletrônica, microeletrodos específicos, capazes de explorar a interface metal/solução, análises microbiológicas e metodologias específicas para detecção de corrosão localizada vêm permitindo o melhor entendimento da participação dos microrganismos na deterioração de materiais, o que por sua vez contribuirá para o controle da corrosão (VIDELA, 2003).

II.3 - BIOFILME

Os microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza e apresentam tendência a aderir às superfícies que ofereçam condições favoráveis ao seu desenvolvimento, formando estruturas denominadas de biofilmes.

De acordo com o conceito mais moderno, os biofilmes podem ser definidos como estruturas complexas constituídas de agregados de células microbianas inseridas numa matriz exopolissacarídica e canais intersticiais, por onde ocorre a passagem do fluido circulante (Figura 2) (LEWANDOWSKI *et al.*, 1995).

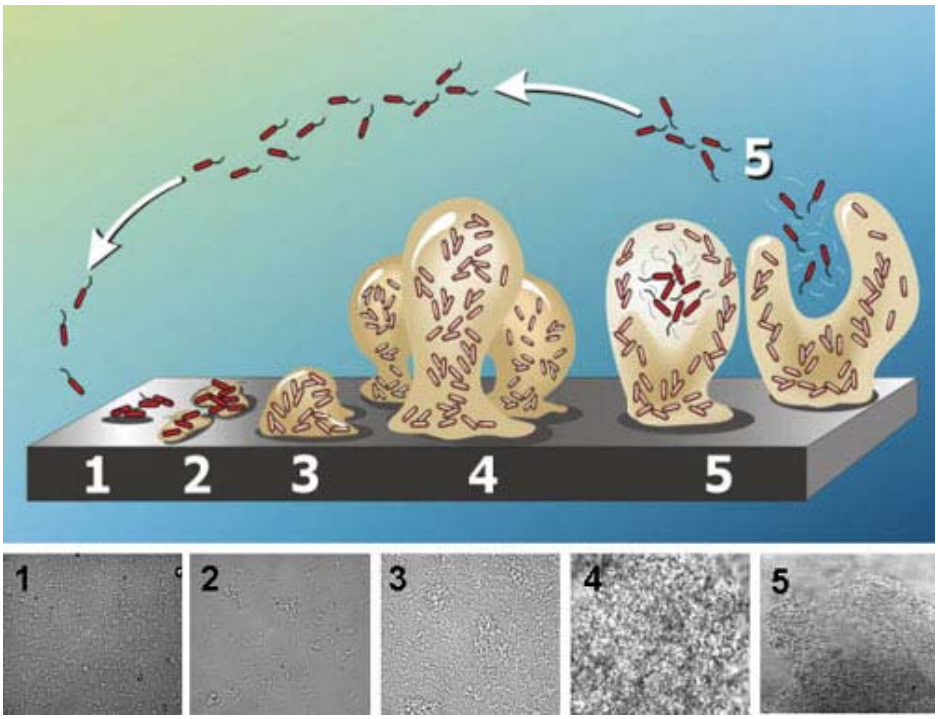


Figura 2: Modelo de biofilme segundo Blicq, 2008
(etapas descritas no texto).

Os biofilmes ocorrem tanto em ambientes naturais quanto industriais, especialmente quando na fase aquosa há limitação de nutrientes. A adsorção microbiana às superfícies sólidas é uma conhecida estratégia adotada por microrganismos em meio oligotrófico, de forma a beneficiarem-se do acúmulo de nutrientes sobre as superfícies. (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

As etapas de formação do biofilme já foram descritas por diversos autores (LEWANDOWSKI, 2000; BEECH e SUNNER, 2004; JANNING *et al.*, 2005), podendo ser apresentadas, de maneira geral, como:

1) formação de um filme de material orgânico e inorgânico que modifica a distribuição de cargas na superfície sólida, facilitando a aderência dos microrganismos presentes no líquido (microrganismos planctônicos);

2) adesão e multiplicação de microrganismos aeróbios (sésseis);

3) produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por alguns microrganismos;

4) crescimento de microrganismos anaeróbios internamente ao biofilme;
5) aumento da espessura do biofilme, o que pode favorecer o desprendimento das camadas mais externas.

O EPS pode ser constituído de lipídeos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. O conteúdo dessas macromoléculas no EPS varia, dependendo da espécie bacteriana produtora e das condições nutricionais e ambientais (CHAN, XU e FANG; 2002). O material polimérico, além de favorecer a fixação dos microrganismos também serve como fonte nutricional no caso de uma condição de estarvação, ou seja, baixa disponibilidade de nutrientes (COSTERTON *et al.*, 1995). As proteínas e carboidratos que compõem os exopolímeros podem ainda se ligar a íons metálicos através de seus grupos funcionais o que pode intensificar o processo corrosivo (BEECH, 2004). Ademais, a presença de EPS no biofilme pode ter ação protetora a diferentes produtos químicos, como por exemplo, protegendo os microrganismos contra a exposição direta a metais e biocidas que poderiam inativá-los rapidamente caso estivessem livres na fase aquosa (planctônicos). Do mesmo modo, a presença do biofilme impede o contato da superfície metálica com inibidores de corrosão, eventualmente adicionados ao sistema com o objetivo de controlar o processo corrosivo. Estes inibidores são substâncias químicas que, adicionadas em quantidade adequada, inibem as reações anódicas, catódicas ou ambas (GENTIL, 2003).

Os biofilmes são ecossistemas microbianos complexos uma vez que nele podem coexistir espécies de diferentes grupos microbianos como bactérias, fungos, algas e protozoários. Cabe salientar que as bactérias são os principais microrganismos envolvidos na formação dos biofilmes. A complexidade das populações envolvidas, bem como a espessura do biofilme, criam entre outros fatores, um gradiente de aeração através das várias camadas de sua estrutura. Deste modo, são formados diferentes nichos com condições adequadas para o

desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, incluindo as bactérias redutoras de sulfato (BRS). As BRS geram metabólitos considerados principais causadores da corrosão localizada usualmente na forma de pite (CASTANEDA e BENETTON, 2008). A formação de pites se caracteriza por corrosão localizada do material em áreas limitadas, mas, em geral, de considerável profundidade (GENTIL, 2003). A Figura 3 representa essa forma de corrosão.

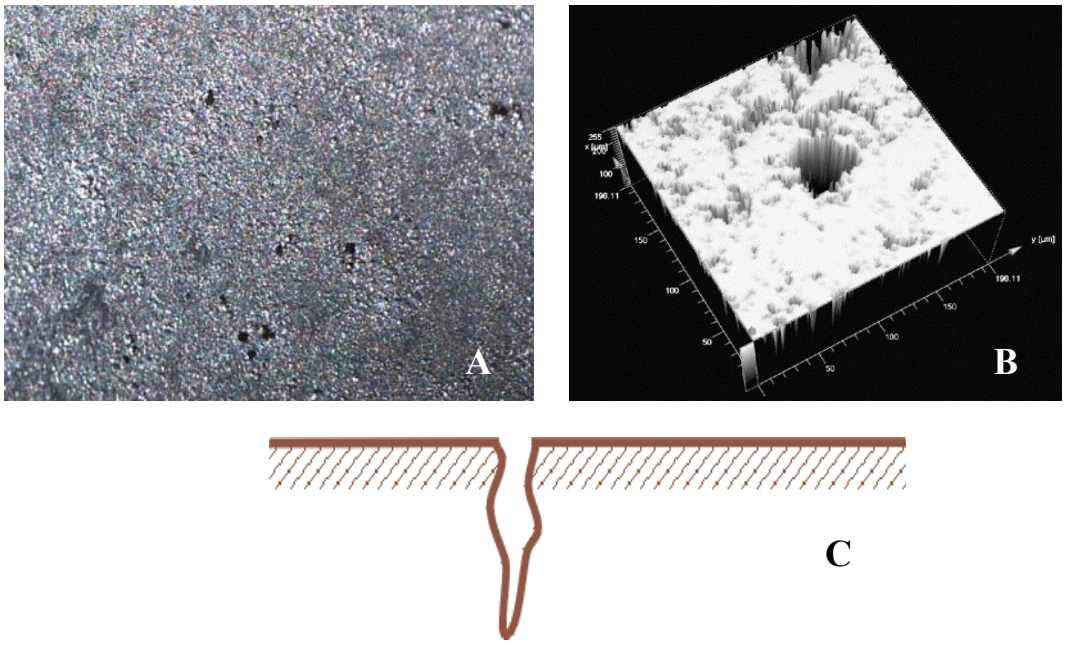


Figura 3: Imagens de pites formados sobre uma superfície metálica: a) observação feita através de estereoscópio (20X de aumento) ; b) por microscopia eletrônica de varredura confocal (CSLM) e c) representação de um corte transversal (SOUZA *et al.*, 2005 e RAO, *et al.*, 2005).

Os sistemas industriais possuem várias características que podem favorecer a colonização de superfícies metálicas por microrganismos, como por exemplo, a ocorrência de água estagnada, água não tratada e vazões intermitentes de fluidos em dutos (LICINA, 1990 *apud* GONÇALVES, 2003). A adesão de microrganismos cria uma nova condição na interface metal/solução que pode favorecer a deterioração do metal.

II.4 - MICRORGANISMOS QUE PARTICIPAM DA CMI

Diversos microrganismos podem participar do processo de biocorrosão, direta ou indiretamente. Em geral, os microrganismos que participam da CMI são quantificados e estudados como grupos microbianos. Esses grupos englobam microrganismos de diferentes espécies que apresentam características em comum. A seguir, serão descritos apenas os grupos microbianos freqüentemente isolados e reconhecidamente envolvidos em casos de CMI.

II.4.1 – Bactérias oxidantes de enxofre

A maioria das bactérias envolvidas na CMI fazem parte do ciclo do enxofre na natureza, como é o caso das bactérias oxidantes do enxofre. Dentre as bactérias oxidantes de enxofre, destaca-se o gênero *Acidithiobacillus,* antigamente denominado de *Thiobacillus* (KELLY e WOOD, 2000), que são microrganismos quimioautotróficos aeróbicos que utilizam o dióxido de carbono como única fonte de carbono. Por exemplo, a espécie *A. thiooxidans* é capaz de oxidar 31 g de enxofre por grama de carbono, causando uma elevada acidez no meio, devido à produção metabólica de ácido sulfúrico, podendo reduzir o pH a valores inferiores a 0,5 (SAND e GEHRKE, 2003). Essa elevada acidez confere grande agressividade ao ambiente, não apenas para superfícies metálicas, mas também para estruturas de pedra e concreto (WARSCHEID e BRAAMS, 2000).

II.4.2 – Bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) encontram-se espalhadas em zonas anaeróbicas de diferentes ambientes como solo, sedimentos, águas doce e salgada assim como na boca e intestino de muitos animais, incluindo o homem (MATIAS *et al.*, 2005). Esses

microrganismos são particularmente relevantes em habitats marinhos devido à alta concentração de sulfato na água do mar. As BRS são consideradas os principais microrganismos envolvidos no processo de corrosão microbiológica (JAVAHERDASHTI, 1999) e na acidificação de reservatórios de óleo e gás pelo sulfeto produzido (RAJASEKAR *et al.*, 2005).

As BRS são bactérias heterotróficas capazes de metabolizar fontes de carbono diferenciadas, desde moléculas simples até hidrocarbonetos (KNIEMEYER *et al.*, 2007). Membros do gênero *Desulfovibrio* são os representantes mais estudados deste grupo microbiano (RABUS *et al.*, 2000), os quais utilizam ácidos orgânicos, álcoois ou hidrogênio molecular como fonte de energia para a redução do sulfato. O resultado dessa redução é a produção de sulfetos, bissulfetos e gás sulfídrico, assim como produtos metabólicos intermediários (tiossulfato, tetrationatos, politionatos), que possuem um papel importante na corrosão anaeróbica do ferro (GONZÁLEZ *et al.*, 1998).

O hidrogênio é um importante componente no metabolismo da maior parte das BRS. Ele pode ser usado como única fonte de energia, na presença de acetato ou CO_2 como fonte de carbono (BRANDIS e THAUER, 1981). As enzimas diretamente envolvidas no metabolismo de hidrogênio molecular, chamadas de hidrogenases, são responsáveis pela oxirredução do hidrogênio: $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$.

As hidrogenases podem ser classificadas em dois grupos principais em relação aos metais presentes nos sítios ativos: [Fe] hidrogenase e [NiFe] hidrogenase. Segundo a revisão de Matias *et al.* (2005), essas proteínas podem ser citoplasmáticas, periplasmáticas ou ainda estar associadas à membrana. Quando uma BRS cresce as custas de hidrogênio, a sua oxidação se dá pelas hidrogenases periplasmáticas. Essas enzimas clivam o H_2 liberando prótons no periplasma enquanto os elétrons são transferidos para o citoplasma para a redução do sulfato, gerando assim um gradiente de prótons através da membrana (Figura 4). Essas enzimas vêm sendo cada vez mais estudadas devido ao

seu possível envolvimento na teoria da despolarização catódica que será discutida no item II.5.5.

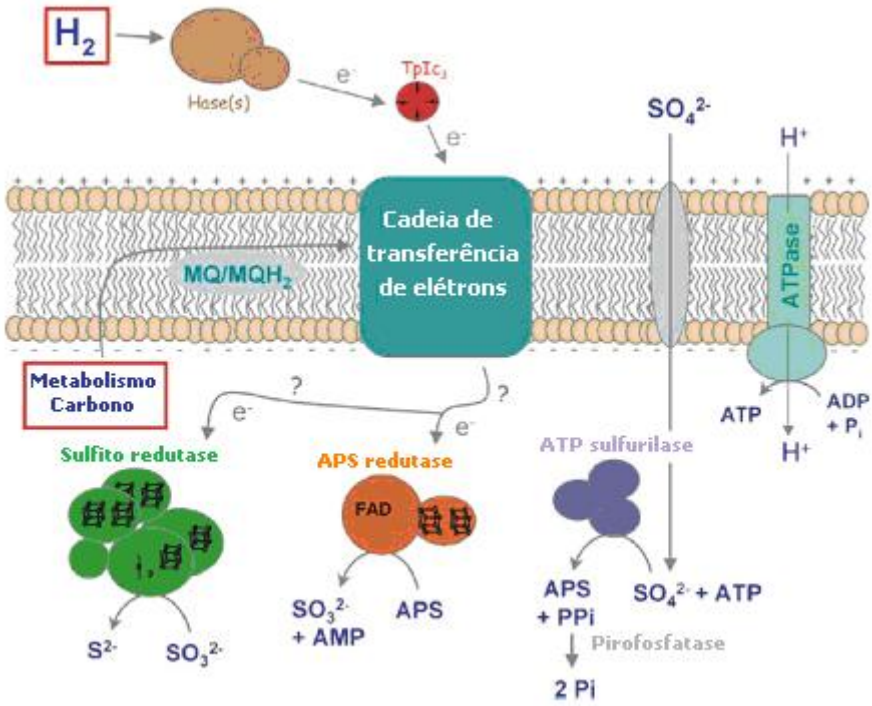


Figura 4: Representação esquemática da cadeia de transferência de elétrons em *Desulfovibrio*, com H_2 como fonte de energia e sulfato como aceptor final de elétrons (MATIAS *et al.*, 2005).

Considerando que as BRS são microrganismos aerotolerantes, a corrosão ocorre abaixo de tubérculos (camadas de produto de corrosão), sob os quais pode-se encontrar pites profundos, em função do ataque ao metal pelos sulfetos produzidos durante seu metabolismo (GENTIL, 2003).

II.4.3 – Bactérias produtoras de ácido

Na natureza encontram-se também várias bactérias heterotróficas que apresentam a capacidade de produzir ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como os ácidos fórmico, acético, lático, propiônico, butírico, úrico. As assim denominadas bactérias produtoras de ácido estão diretamente relacionadas à biocorrosão pela produção de substâncias

corrosivas. Nos últimos anos, essas bactérias vêm recebendo especial atenção devido a sua relação com as BRS, uma vez que esses ácidos secretados podem ser metabolizados pelas BRS (Figura 5). Assim, o efeito sinergético desses dois grupos microbianos pode intensificar a CMI (BOGAN *et al.*, 2004).

A atividade de outras espécies bacterianas também pode resultar na geração de ácidos inorgânicos como ácido nítrico (*Nitrobacter, Pseudomonas*), ácido nitroso (*Nitrosomonas*) e ácido sulfídrico (BRS, *Clostridium*) (VIDELA, 2003).

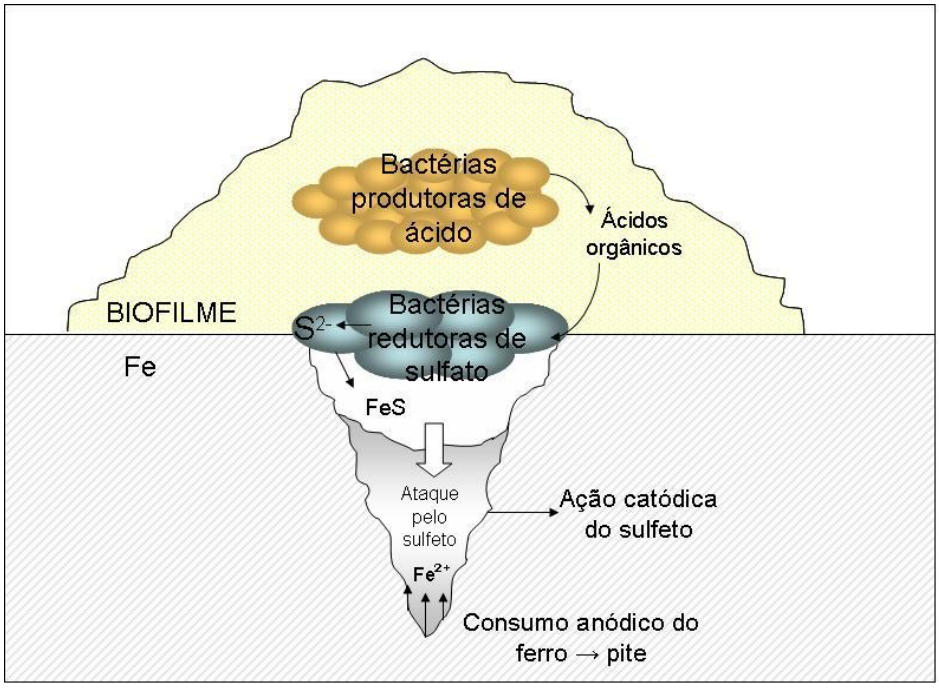


Figura 5: Esquema da interação entre as bactérias produtoras de ácido e as BRS na biocorrosão (Adaptado de PINEAU, *et. al.*; 2003).

II.4.4 - Bactérias precipitantes de ferro

Dentre este grupo de microrganismos, também conhecido como grupo das ferrobactérias, encontram-se as bactérias redutoras e oxidantes do ferro. estão também envolvidas na CMI. Dentre as oxidantes do ferro, destaca-se a espécie *Acidithiobacillus ferroxidans* e os gêneros *Gallionella* e *Crenothrix* (EDWARDS *et al.*, 2001). Esses

microrganismos são aeróbios e obtêm a energia necessária ao seu metabolismo a partir da oxidação do íon ferroso a férrico. Em decorrência desse processo de oxidação, há a formação de hidróxidos de ferro, que por serem em geral insolúveis, precipitam sobre as superfícies, possibilitando a corrosão por aeração diferencial, a ser descrito no item II.5.4 (STAROSVETSKY *et al.*, 2001).

II.4.5 - Bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPS)

Dentre as bactérias ainda cabe mencionar as do gênero *Pseudomonas*. Essas bactérias têm importante papel no processo corrosivo, já que produzem polímeros extracelulares (EPS), que protegem as células contra os íons metálicos e criam condição de anaerobiose, o que favorece o desenvolvimento das BRS presentes no interior do biofilme (BEECH e GAYLARDE, 1989).

Bactérias pertencentes à espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentam capacidade de se associar ao fungo filamentoso do gênero *Hormoconis* e as BRS em biofilmes formados nas paredes internas de tanques de combustível de aviões a jato. Essas associações, aparentemente, foram responsáveis por graves casos de corrosão do alumínio e suas ligas (VIDELA, 2003).

II.4.6 – Fungos

Os fungos filamentosos secretam uma ampla gama de enzimas hidrolíticas e oxidativas que frequentemente estão relacionadas com a destruição de revestimentos de estruturas metálicas. Além disso, alguns fungos produzem ácidos orgânicos, podendo então ocasionar a corrosão de materiais metálicos como cobre, ferro e alumínio (JUZELIUNAS *et al.*, 2007). Little *et al.* (2001) citam a corrosão de aço carbono devido à produção de metabólitos ácidos e dióxido de carbono por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. Além disso, os fungos podem contribuir para o aumento da espessura do biofilme.

II.4.7 – Algas

Algumas algas são reconhecidamente capazes de produzir ácidos orgânicos (MARCUS e OUDAR, 1995). Entretanto, a maior contribuição das algas em processos corrosivos pode estar relacionada ao favorecimento do crescimento dos outros microrganismos presentes no biofilme. A atividade das algas nos biofilmes gera oxigênio, que favorece a produção de EPS pelas bactérias, criando condição de anaerobiose propícia para a atividade das BRS, conseqüentemente promovendo a corrosão das superfícies abaixo dos biofilmes.

Como a quantidade de ácido gerada pelas algas não representa risco potencial na deterioração de materiais, a presença de espécies desse grupo microbiano não interfere diretamente no processo de corrosão. Por isso, de um modo geral, a sua quantificação não é feita durante o monitoramento microbiológico dos sistemas industriais (SODRÉ, 1996).

II.5 - MECANISMOS DE BIOCORROSÃO

Pela natureza eletroquímica da corrosão verifica-se o aparecimento de áreas anódicas e catódicas na superfície do material metálico, com a conseqüente ocorrência de um fluxo de corrente elétrica no sentido convencional, das áreas anódicas para as catódicas através do eletrólito, sendo o retorno dessa corrente realizado por intermédio do contato metálico entre essas regiões (Figura 6).

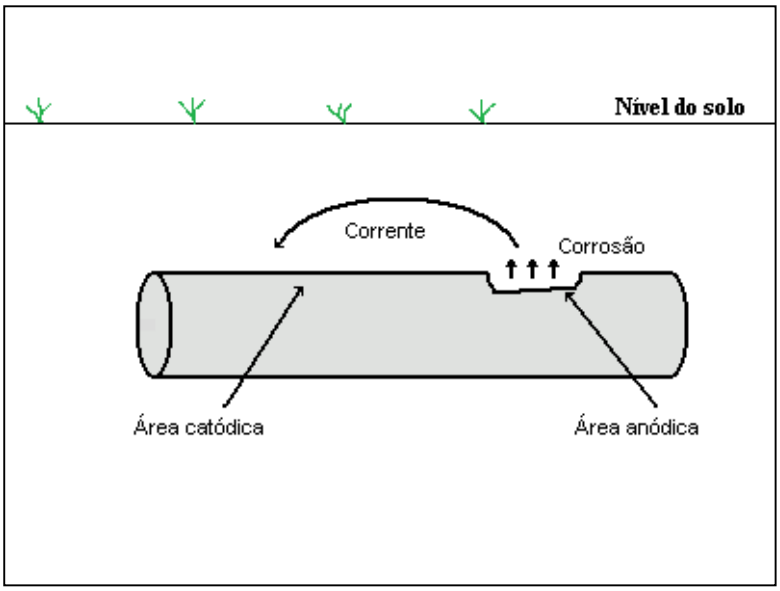


Figura 6: Corrosão em duto enterrado (GENTIL, 2003).

Os microrganismos participam do processo corrosivo de forma ativa, sem alterar contudo, a natureza eletroquímica do fenômeno, apenas intensificando o processo de corrosão através de diferentes mecanismos. Cabe ressaltar que os biofilmes são constituídos de consórcios microbianos, assim, todos esses mecanismos que serão descritos a seguir, podem transcorrer de forma simultânea ou consecutiva, sendo muito difícil que um caso de biocorrosão se deva a um único mecanismo.

II.5.1 - Produção de metabólitos corrosivos

Como anteriormente mencionado (item II.4.1 e II.4.3), alguns microrganismos são capazes de sintetizar e secretar ácidos durante o seu metabolismo. Esses ácidos ao entrarem em contato com a superfície metálica podem destruir o filme protetor (camada de passivação) de uma determinada superfície intensificando a corrosão (ANGELL, 1999).

II.5.2 - Consumo de inibidores de corrosão pelo metabolismo microbiano

Bactérias e fungos podem acelerar a corrosão indiretamente, já que algumas espécies apresentam a capacidade de metabolizar substâncias usadas para inibir a corrosão (MORTON & SURMAN, 1994). Este é o caso do consumo fúngico de nitratos – inibidores de corrosão do alumínio – como fonte de nitrogênio.

II.5.3 - Destruição de revestimentos protetores

Pode ocorrer ainda a destruição de revestimentos protetores que são aplicados sobre diferentes superfícies metálicas. Muitas vezes, esses revestimentos são de natureza orgânica e podem servir de nutrientes para diferentes microrganismos (DAVIS, 1967). Os ácidos produzidos também podem contribuir para a degradação desses recobrimentos, assim como os gases formados durante o metabolismo microbiano. Esses gases podem difundir-se, gerando pressão em regiões que apresentam descontinuidades, como inclusões e vazios, ocasionando a formação de bolhas, que levam à ruptura da proteção.

II.5.4 - Indução da formação de células de aeração diferencial

O processo de corrosão por aeração diferencial ocorre quando um material metálico é exposto a regiões diferentemente aeradas (Figura 7). Assim, qualquer biofilme que não seja capaz de promover o recobrimento total e uniforme de uma dada superfície (do metal ou liga), será um gerador de células de aeração diferencial em potencial (GENTIL, 2003).

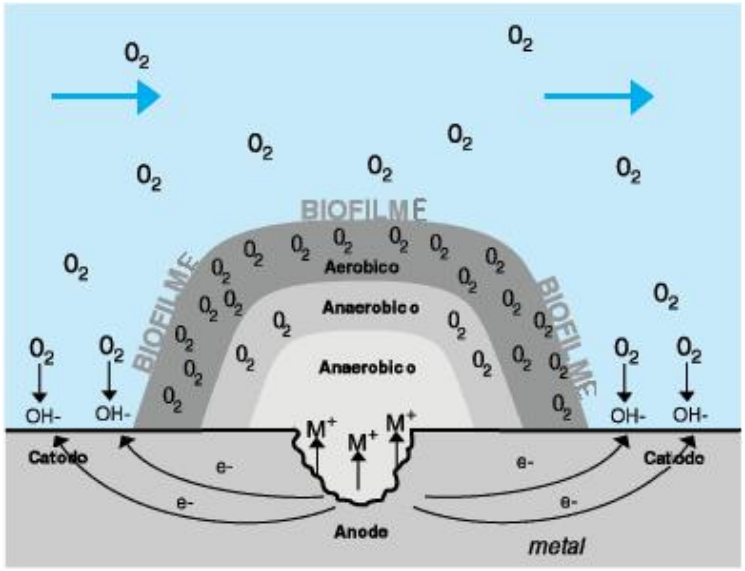


Figura 7: Biocorrosão por aeração diferencial (BORENSTEIN, 1994).

No caso dos biofilmes, a complexidade das populações presentes, bem como a presença de EPS, evitam a difusão de oxigênio. Em conseqüência, se estabelece uma condição de anaerobiose na base do biofilme. Considerando que a formação de biofilme sobre superfícies sólidas não é capaz de recobrir uniformemente toda a superfície, criam-se regiões aeradas e não aeradas, favorecendo a corrosão por aeração diferencial (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

II.5.5 - Despolarização Catódica

Em princípio, a dissociação da água resulta na formação de hidrogênio molecular que se adsorve à superfície metálica, polarizando-a e, por conseguinte impedindo a evolução do processo corrosivo uma vez que detêm a recombinação de átomos de hidrogênio na zona catódica (Figura 8).

Segundo a Teoria da Despolarização Catódica (VON WOLZOGEN KÜHR e VAN DER VLUGT, 1961), o processo de biocorrosão ocorre na região catódica pelo consumo enzimático do hidrogênio molecular, mediante a capacidade hidrogenásica de algumas BRS, conforme citado no item II.4.2 (POSTGATE, 1984).

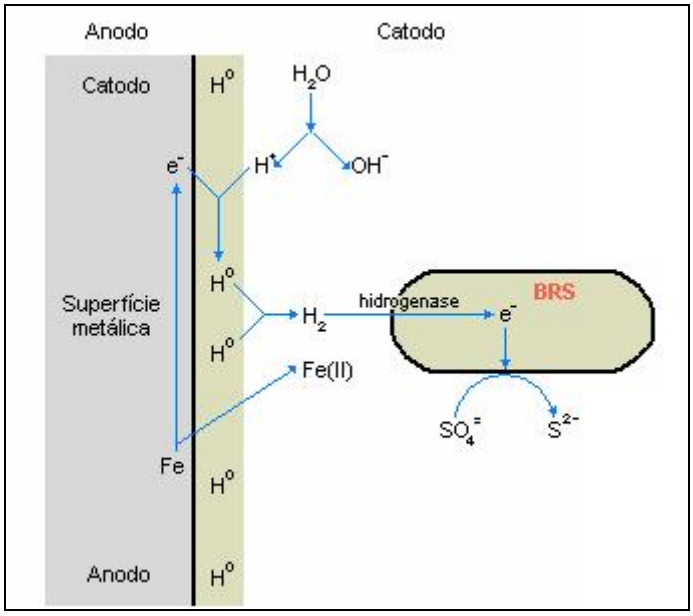


Figura 8: Esquema da despolarização catódica (POTEKHINA *et al.*, 1999 *apud* GONÇALVES, 2002).

Essa teoria tem sido questionada nas últimas décadas (EDYVEAN *et al.*, 1992; VIDELA, 2001; PINEAU, 2003) por não considerar o efeito corrosivo do sulfeto de hidrogênio e/ou sulfeto de ferro, produtos de corrosão. Além disso, considera apenas a ação dos microrganismos que possuem a enzima hidrogenase, não mencionando os demais microrganismos envolvidos no processo corrosivo.

II.6 - INCIDÊNCIA PRÁTICA E ECONÔMICA DA BIOCORROSÃO

Segundo avaliação realizada nos Estados Unidos pelo *CC Technologies Laboratories, Inc.* sob supervisão da *U.S. Federal Highway Administration* (FHWA) e apoio da NACE (NACE International – The Corrosion Society), estima-se que os prejuízos causados pela corrosão metálica correspondem a 3,1% do Produto Interno Bruto (PIB) daquele país, ou seja, aproximadamente 276 bilhões de dólares por ano (KOCH *et al.*, 2001). Calcula-se que um terço desse valor poderia ser

economizado com o uso de materiais mais resistentes à corrosão e técnicas mais adequadas de combate à corrosão, incluindo a otimização do projeto e práticas de manutenção mais eficazes.

No Brasil, embora não haja levantamentos específicos, é comum adotar-se o índice de 3,5% do PIB com os gastos com corrosão, o que corresponderia a cerca de R$ 45 milhões.

Contudo, não foi encontrado nenhum levantamento que correlacione os custos de corrosão química e microbiológica. Existe apenas uma estimativa feita por Javaherdashti (1999) que calcula que o custo poderia estar em torno de 20-30% do total da corrosão. Esses custos têm origens muito diversas e podem estar relacionados a paradas freqüentes das instalações para limpeza ou substituição de peças corroídas, perdas de produto através de tubulações ou tanques corroídos, alterações de produto pelo desprendimento de depósitos biológicos que podem se formar nas paredes de tanques de armazenamento, dutos, etc.

Poucas indústrias estão livres da ocorrência de biocorrosão e de outros problemas relacionados à formação de biofilmes. Por exemplo, na Grã-Bretanha, 50% dos casos de corrosão em tubulações enterradas foram atribuídas a causas microbiológicas (IVERSON, 1987). A indústria do petróleo, em suas atividades de extração, processamento, distribuição e armazenamento, apresenta freqüentes e graves problemas causados pela ação corrosiva associada a depósitos biológicos. Além da indústria do petróleo, também apresentam problemas de biocorrosão as indústrias naval e portuária, as usinas hidroelétricas, as nucleares, as indústrias químicas e de processos, as refinarias de álcool, os sistemas de distribuição de gás natural, óleo e combustíveis, de distribuição e armazenamento de água potável, entre outras (SILVA *et al.*, 1986; VIDELA, 2003; MOISEEVA e KONDROVA, 2005). Já foi relatado caso de biocorrosão até mesmo no interior de estação espacial (KLINTWORTH e REHER, 1999).

Diversos metais e ligas estão sujeitos à biocorrosão. Já foram reportados casos de CMI em aço carbono, latão, cobre, zinco, alumínio e, até mesmo, em metais mais resistentes a corrosão química, como o aço inoxidável e o titânio (RAO *et al.*, 2005; JUZELIUNAS *et al.*, 2007).

Com o avanço tecnológico, os custos de combate à corrosão evidentemente se elevam, tornando-se um fator de grande importância a ser considerado já na fase de projeto de grandes instalações industriais para evitar ou minimizar sua corrosão e consequentemente, prolongar a vida útil.

II.7– DETECÇÃO E MONITORAMENTO DA BIOCORROSÃO

Os programas de monitoramento da biocorrosão aumentaram em complexidade a partir dos últimos anos do século XX. No final dos anos 80, mesmo em sistemas cujas condições eram indicativas da ocorrência de corrosão microbiológica, somente se controlava a corrosão química, a formação de incrustações e, em alguns casos, a concentração de bactérias planctônicas. No entanto, tais análises não permitem detectar ou prever os efeitos prejudiciais da biocorrosão (VIDELA, 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas para o monitoramento da corrosão em dutos é a utilização dos *pigs* inteligentes ou instrumentados. A passagem desse instrumento internamente ao duto, impulsionados pelo próprio fluido transportado, permite estimar a área corroída, a sua localização, bem como a aquisição de dados para posterior classificação do processo corrosivo (TORRES, 2001). No entanto, esses instrumentos são incapazes de detectar a corrosão microbiológica uma vez que esta é localizada (pites).

O uso de técnicas de amostragem e monitoramento adequados, complementados por metodologias microbiológicas e eletroquímicas é necessário para entender os efeitos resultantes da atividade microbiana e o papel dos biofilmes no processo de corrosão e, depois, implementar

medidas de prevenção adequadas. Cabe ressaltar que essa avaliação tem de ser realizada para cada sistema em particular, considerando as condições operacionais, composição físico-química da água utilizada e a concentração e características dos microrganismos presentes no sistema (VIDELA, 2003).

A seguir serão descritos os métodos usuais de detecção/monitoramento da biocorrosão.

II.7.1 – Métodos Microbiológicos

O monitoramento da biocorrosão deve ser realizado pelo uso de dispositivos incorporados ao sistema que permitam a avaliação apropriada da população microbiana planctônica e séssil presente. É necessário identificar os grupos microbianos e enumerar os microrganismos causadores da corrosão. Em geral, realiza-se a contagem de bactérias aeróbias totais, bactérias redutoras de sulfato, bactérias anaeróbias totais e produtoras de ácido (VIDELA, 2003). Essa contagem pode ser feita, dentre outras formas, através de técnicas tradicionais de crescimento em meios seletivos, através de contagem direta por microscopia, ou ainda através de técnicas moleculares.

II.7.2 – Análises fisico-químicas

As determinações do teor de oxigênio, sulfeto, cloreto, pH, umidade, são importantes para o monitoramento da água ou solo onde se encontra a estrutura metálica uma vez que essas variáveis influenciam diretamente o processo corrosivo e o metabolismo dos microrganismos.

II.7.3 – Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos baseiam-se na natureza eletroquímica dos processos corrosivos, podendo ser utilizados com sucesso em inúmeras aplicações. Esses métodos permitem a detecção de alterações sensíveis na cinética do processo corrosivo, o que os tornam extremamente atraentes para efetuar o monitoramento *in situ* da evolução do processo corrosivo em equipamentos industriais, através de sistemas informatizados de aquisição de dados (GENTIL, 2003).

O uso de técnicas eletroquímicas para o monitoramento da corrosão microbiologicamente induzida tem sido intensamente estudado. Contudo, é uma área que ainda requer estudos para padronização e implementação em experimentos de laboratório e aplicação em campo.

· Potencial de corrosão

O potencial de corrosão (E_{corr}), ou potencial a circuito aberto, pode ser tomado pela diferença entre o metal, imerso no meio corrosivo, e o eletrodo de referência. Dada a sua simplicidade, a determinação do potencial de corrosão tem sido usada em estudos sobre a formação de biofilmes (IGNATIADIS e AMALHAY, 2001).

Em dutos, o monitoramento eletroquímico pode ser feito através da instalação de segmentos que possuem eletrodos acoplados (Figura 9).

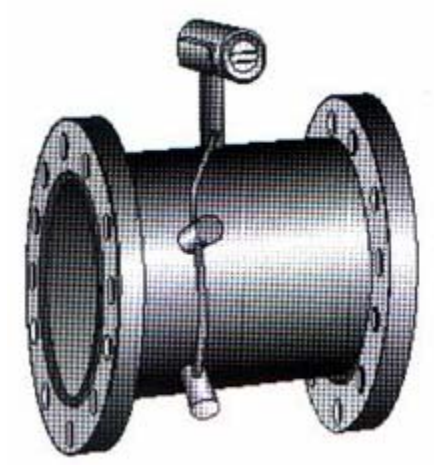


Figura 9: Duto contendo eletrodos acoplados para monitoramento eletroquímico (TORRES, 2001).

· Curvas de polarização

Para o levantamento das curvas de polarização utiliza-se um potenciostato em conjunto com um eletrodo de referência e um contra-eletrodo para medir o potencial de corrosão. A operação consiste em polarizar o eletrodo de trabalho fixando valores de potencial (E) na direção catódica (valores mais negativos), anódica (valores menos negativos) ou ambas, registrando os valores correspondentes de corrente elétrica (i) revelados pelo próprio aparelho. A polarização pode ser feita de dois modos: controlando o potencial (potenciostática ou potenciodinâmica) ou a corrente aplicada (galvanostática ou galvanodinâmica). A partir dos potenciais e das correntes obtidas constrói-se as curvas de polarização que representam as reações catódica e anódica (Figura 10).

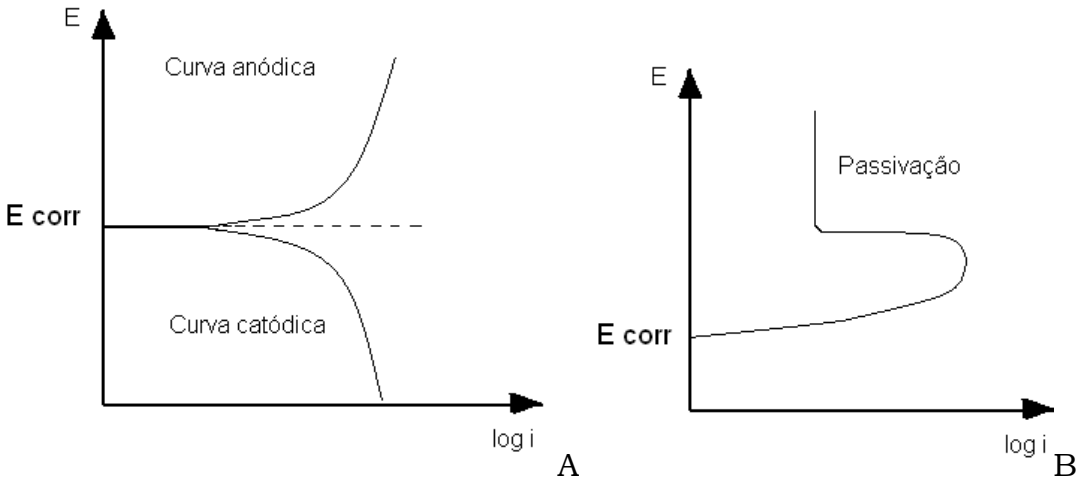


Figura 10: (A) Curva de polarização catódica e anódica e (B) Curva anódica mostrando região de passivação (NUNES, 2007).

Essas curvas dão indicação da formação de películas protetoras quando o metal sofre passivação de algum tipo (ex: aço inox, alumínio em alguns meios). Quando há formação de película protetora, a corrente fica extremamente baixa, seguindo quase paralela ao eixo *y*. Pode ocorrer ainda a formação de película após certo fornecimento de corrente (Figura 10b); assim, há uma redução brusca na densidade de corrente para uma faixa de potencial, até que haja rompimento da camada passivadora por alguma reação anódica que promova elevação da corrente. Quando a corrente é variada ao longo do processo de polarização, indicando a ausência de película passivadora, pode-se dizer que está ocorrendo uma dissolução ativa, ou seja, o metal está corroendo (Figura 10a).

Deste modo, através das curvas de polarização pode-se verificar a formação de filmes protetores, dissolução ativa do metal no meio e, em alguns casos a corrente de corrosão (GENTIL, 2003).

II.8 - MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA CMI

Diversos métodos podem ser empregados para prevenir e/ou controlar a corrosão microbiologicamente induzida. A escolha do

método será ditada pela relação custo-benefício, ou seja, eficiência pretendida e estimativa de custos. Contudo, a fim de selecionar o tratamento adequado deve-se considerar ainda a característica do sistema como o tipo de funcionamento (aberto ou fechado), a característica da água, a geometria do sistema, os materiais estruturais, etc.

A seguir serão relacionados alguns dos métodos atualmente indicados para prevenção da CMI (VIDELA, 2002). A proteção catódica por ser uma técnica de destaque será abordada num item a parte (item II.9).

II.8.1 - Limpeza mecânica

A limpeza mecânica envolve qualquer método capaz de remover fisicamente depósitos formados sobre superfícies metálicas. Inclui-se a escovação, a utilização de jatos d'água com alta pressão (*hydroblast*) ou materiais abrasivos e, principalmente, o tratamento por *pigging*. Esse último é o mais empregado na limpeza de dutos e caracteriza-se pela utilização de instrumentos, denominados *pigs*, que ao serem inseridos no sistema, se deslocam no interior dele com a pressão da água ou do próprio fluido transportado na tubulação. Durante o seu percurso, o *pig* remove incrustações, depósitos orgânicos e qualquer material que esteja aderido à parede interna da tubulação.

Entretanto, esse tipo de limpeza pode resultar em aumento da concentração de microrganismos viáveis na fase planctônica não impedindo a recolonização mais a frente do sistema. Assim, torna-se necessária a aplicação freqüente desse tratamento, o que sem dúvida aumenta o custo operacional. Além disso, a passagem freqüente de *pig* pode diminuir a espessura da tubulação devido à abrasividade do próprio instrumento, podendo aumentar a rugosidade da superfície, o que facilita a adesão de microrganismos.

II.8.2 - Limpeza química

A limpeza química é geralmente aplicada após a limpeza mecânica sendo mais efetiva na limpeza de espaços fechados de difícil acesso e zonas de ataque localizado. Nesse tipo de limpeza, pode-se utilizar ácidos minerais, ácidos orgânicos e quelantes (compostos orgânicos e inorgânicos capazes de formar complexos com íons metálicos).

O tratamento com substâncias químicas, denominadas biocidas, é um dos métodos mais utilizados contra a CMI. Em geral, a aplicação destas substâncias ocorre depois da limpeza mecânica, sendo mais eficiente em espaços fechados e zonas de ataque localizado. Os biocidas são capazes de eliminar ou inibir o crescimento microbiano e podem ser tanto inorgânicos, como cloro, ozônio e bromo, como orgânicos, tais como, isotiazolonas, sais quaternários de amônio e aldeídos (GONÇALVES, 2002).

Os requisitos mais importantes para um biocida de uso industrial são: não ser corrosivo para os metais do sistema, eficácia em baixas dosagens, baixo custo, biodegradabilidade e seletividade para os microrganismos a eliminar (RAMESH e RAJESWARI, 2005). Porém, normalmente os biocidas comercialmente disponíveis são tóxicos e não biodegradáveis. Por isso, apesar de ser um dos métodos mais empregados, o uso freqüente de biocidas pode causar poluição ambiental, podendo ainda ser a causa do surgimento de microrganismos resistentes ao produto. Além disso, na presença de um biofilme espesso, o biocida pode não se difundir da maneira esperada, não eliminando os microrganismos presentes no interior dos biofilmes.

II.8.3 - Revestimentos aplicados por técnica de pintura

A aplicação de revestimentos como método de proteção contra a corrosão microbiologicamente induzida é focada na aplicação de produtos não tóxicos como silicone e resinas tipo epóxi, entre outros.

Em geral, os revestimentos constituem um bom método de prevenção desde que sejam contínuos, visto que qualquer imperfeição da película pode ocasionar a formação de sítios preferenciais para ataque localizado. As pinturas *antifouling* também são usadas como método de controle microbiano, em particular, quando o uso de biocidas é restrito, como, por exemplo, em sistema aberto.

Como citado anteriormente, os microrganismos podem causar a deterioração desses revestimentos (item II.5.3). Assim, essa técnica é normalmente aplicada em conjunto com outro método.

II.8.4 - Técnicas em desenvolvimento

- Biofilmes com produção *in situ* de peptídeos antimicrobianos

Este estudo, realizado em escala de laboratório, utiliza uma espécie de *Bacillus* geneticamente modificada para a produção de gramicidina S, um composto antimicrobiano (ZUO, 2005). O biofilme formado na presença desta bactéria apresentou taxa de corrosão inferior, devido à redução do número de *Desulfovibrio vulgaris* sésseis pelo agente anti-microbiano secretado pelas células de *Bacillus.*

- Biofilmes regenerativos

Pesquisadores do *Electric Power Research Institute* da Califórnia estão investigando uma nova forma de prevenir a CMI pelo uso de biofilmes poliméricos regenerativos produzidos por algumas bactérias (SYRETT, 1995; HERNANDEZ *et al.*, 1994). O uso desse tipo de revestimento seria particularmente vantajoso em relação aos revestimentos usuais devido a sua capacidade regenerativa, não necessitando de manutenção freqüente sendo menos susceptíveis a danos mecânicos.

- Exclusão biocompetitiva

Estratégias de exclusão biocompetitiva têm sido avaliadas, principalmente por indústrias de petróleo, para o controle da corrosão por BRS (ECKFORD e FEDORAK, 2004; STOTT, DICKEN e RIZK, 2008). Em particular, tem sido estudada a adição de nitrato para estimular o crescimento de bactérias redutoras de nitrato (BRN) em detrimento das BRS. Assim, o crescimento das BRS seria reduzido, minimizando os efeitos da CMI. Esta tática já está sendo usada em poços de injeção em alguns países.

II.9 - PROTEÇÃO CATÓDICA

A proteção catódica não é uma técnica recente, sendo utilizada a muitos anos em países desenvolvidos, depois de ter sido experimentada pela primeira vez, na Inglaterra, em 1824, por um cientista, Sir Humphrey Davy, que realizou um estudo extraordinário no campo da eletroquímica. Esse cientista fixou pequenos pedaços de outros materiais, como ferro, estanho e zinco, nas chapas de cobre que revestiam os cascos de madeira dos navios, para retardar a sua corrosão (DUTRA e NUNES, 1991). No Brasil, o início da utilização da proteção catódica se deu por volta de 1964, com a construção do Oleoduto Rio-Belo Horizonte (ORBEL) da PETROBRAS.

Atualmente a proteção catódica é uma técnica consagrada no mundo inteiro para combater a corrosão de estruturas metálicas enterradas ou submersas, e, em menor grau de aplicação prática, para a proteção de estruturas de concreto armado (GENTIL, 2003).

Proteger catodicamente uma estrutura significa eliminar, por processo artificial, as áreas anódicas da superfície do metal, fazendo com que toda a estrutura adquira comportamento catódico. Para tanto, o metal deve ser polarizado em um determinado potencial, de forma a manter o metal em seu domínio termodinâmico de imunidade Como conseqüência, o fluxo de corrente elétrica anodo/catodo no material

deixa de existir e a corrosão é totalmente eliminada. Os métodos usados para proteger catodicamente os materiais serão descritos a seguir (item II.9.1).

Teoricamente, com a utilização da proteção catódica consegue-se manter as estruturas metálicas completamente imunes à corrosão por tempo indeterminado, mesmo para superfícies sem qualquer tipo de revestimento e expostas a condições extremamente agressivas (NUNES, 2007). Porém, a sua aplicação é mais vantajosa quando as superfícies metálicas são previamente revestidas, já que, desta forma, a área a proteger é substancialmente reduzida, diminuindo, portanto, a corrente necessária. A grande vantagem dessa técnica é permitir o controle seguro da corrosão em instalações que, por estarem enterradas ou imersas, não podem ser inspecionadas ou revestidas periodicamente.

II.9.1 - Métodos de proteção catódica

Para a obtenção da proteção catódica, dois métodos podem ser empregados: proteção catódica galvânica e a proteção catódica por corrente impressa. Ambos os métodos apresentam o mesmo princípio de funcionamento, que é o de injeção de corrente elétrica na estrutura através do eletrólito. A escolha, na prática, do método a ser utilizado, depende da análise de várias considerações técnicas e econômicas, sendo que cada um tem vantagens e desvantagens.

- Proteção catódica galvânica

Neste processo, também denominado de proteção catódica por anodos de sacrifício, o fluxo de corrente elétrica fornecido origina-se da diferença de potencial existente entre o metal a proteger e outro escolhido como anodo, que deve apresentar potencial mais negativo de acordo com a Tabela de Potenciais (GENTIL, 2003). Esses metais, utilizados em ligas apropriadas, são eletronegativos em relação ao aço,

podendo protegê-lo com facilidade. Na prática, para a utilização em solos, o magnésio e o zinco são bastante eficientes. Já para a água do mar, o zinco e o alumínio são os mais indicados.

Os anodos galvânicos, quando empregados enterrados, devem ser envoltos em uma mistura de gesso, bentonita e sulfato de sódio, enchimento condutor. Esse enchimento permite a diminuição da resistividade elétrica anodo/solo, reduz os efeitos da polarização do anodo e distribui uniformemente o seu desgaste (Figura 11).

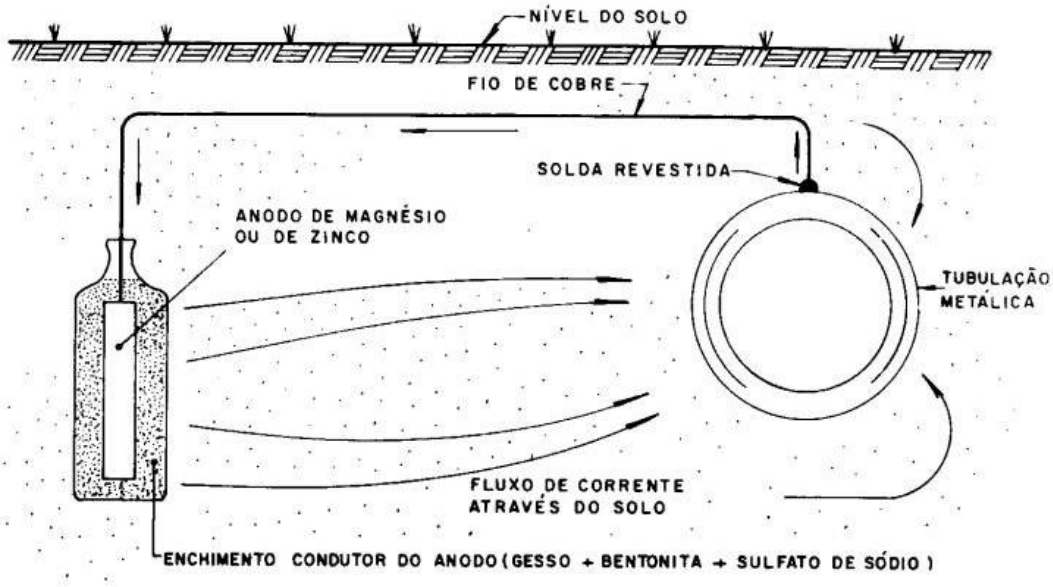


Figura 11: Sistema de proteção catódica galvânica ou por anodo de sacrifício (IEC, 1990).

Quando se dimensiona um sistema de proteção catódica com anodos de sacrifício, uma das preocupações primordiais do projetista deve ser o cálculo de sua vida, uma vez que em função dela serão considerados os aspectos econômicos para a decisão sobre a sua utilização.

Dentre as principais vantagens desse método de proteção catódica pode-se destacar:

• Não requer suprimento de corrente alternada no local.

• Os custos reduzidos com manutenção.

• Não oferecer risco de superproteção.

Por outro lado, a quantidade de corrente fornecida à estrutura é limitada pela diferença de potencial, bastante baixa, entre os anodos e a estrutura. Além disso, a proteção ficará muito mais difícil se as resistividades elétricas do meio no local não forem suficientemente baixas.

- Proteção catódica por corrente impressa

Nesse processo o fluxo de corrente fornecido origina-se da força eletromotriz de uma fonte geradora de corrente elétrica contínua, sendo muito utilizados na prática os retificadores que, alimentados com corrente alternada, fornecem a corrente elétrica contínua necessária à proteção da estrutura metálica (Figura 12). Para a dispersão dessa corrente elétrica no eletrólito são utilizados anodos especiais inertes, ou seja, anodos que apresentam um desgaste muito baixo. A grande vantagem do método por corrente impressa consiste no fato de a fonte geradora (retificador de corrente) poder ter a potência e a tensão de saída necessárias. Podendo assim, ser aplicado em qualquer meio, mesmo naqueles cujo eletrólito seja de elevada resistividade elétrica. Além disso, esse método pode ser aplicado, com economia, para a proteção de instalações metálicas de grande porte.

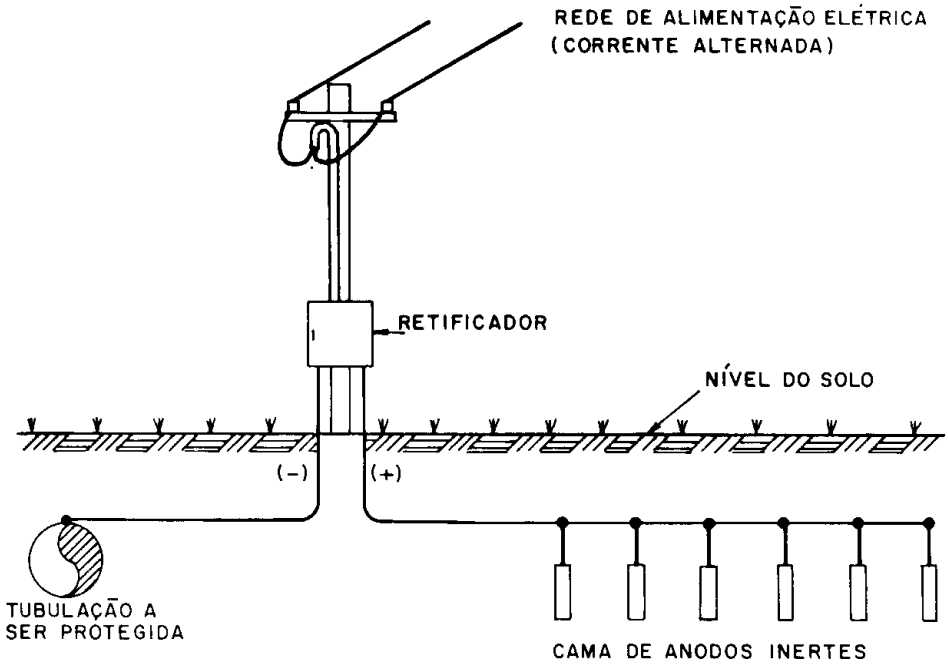


Figura 12: Sistema de proteção catódica por corrente impressa (IEC,1990).

II.9.2 - Mecanismos da Proteção catódica

Alguns mecanismos ocasionam a redução da corrosão quando se aplica a proteção catódica:

1. O potencial do metal é reduzido de modo a atingir um valor tal que, termodinamicamente, impeça que a reação $M \rightarrow M^{n+} + ne^-$ ocorra na superfície metálica, o que no Diagrama de Pourbaix (Figura 13), corresponde a zona de imunidade.
2. O eletrólito adjacente à superfície metálica se torna mais básico devido à redução dos íons hidrogênio, H^+, ou redução do oxigênio

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^- \quad (1)$$

$$H_2O + \tfrac{1}{2} O_2 + 2e^- \rightarrow 2OH^- \quad (2)$$

As reações (1) e (2) levam a um aumento na alcalinidade que, tem um efeito benéfico na proteção de estruturas em água do mar. O bicarbonato presente na água do mar, em condição alcalina gerada pela

reação catódica, tende a formar carbonatos. Por sua vez, a precipitação de carbonatos de cálcio e de magnésio é reconhecidamente importante por agir como uma barreira física contra o ataque generalizado da corrosão, podendo reduzir o teor de oxigênio dissolvido em contato com as superfícies metálicas. Consequentemente, há a redução da densidade de corrente necessária para manter um dado potencial, o que minimiza os custos da proteção catódica. A formação destes precipitados pode ser dada por:

$$HCO_3^- + OH^- \rightarrow H_2O + CO_3^= \quad (3)$$

$$Mg^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mg(OH)_2 \quad (4)$$

$$Ca^{2+} + CO_3^= \rightarrow CaCO_3 \quad (5)$$

$$Ca^{2+} + Mg^{2+} + 2CO_3^= \rightarrow CaCO_3.MgCO_3 \quad (6)$$

A corrente aplicada ao metal deve ser tal que situe o potencial eletroquímico da estrutura metálica na região de imunidade, que pode ser determinado pelo diagrama de equilíbrio eletroquímico potencial versus pH (E_h x pH), também denominado diagrama de Pourbaix (Figura 13). De acordo com o diagrama para o sistema Fe-H_2O, a 25°C e 1 atm, verifica-se que, em função do pH do meio, há um potencial abaixo do qual o metal se encontra imune à corrosão, ou seja, o ferro se encontra em seu estado metálico.

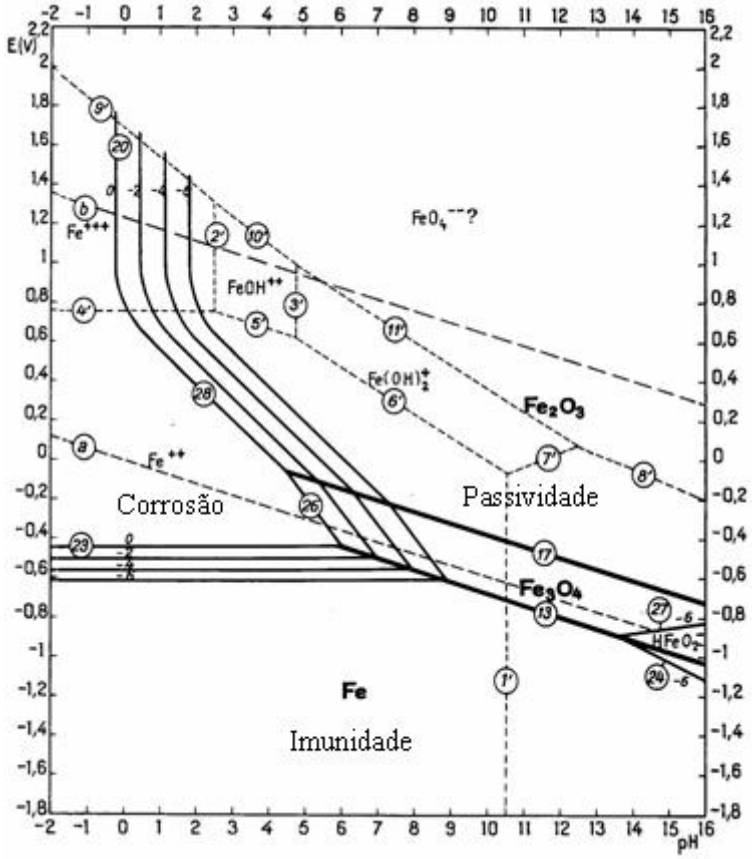


Figura 13: Diagrama de Pourbaix (GENTIL, 2003).

II.9.3 - Critérios de proteção catódica

Alguns critérios têm sido adotados na prática para se determinar o potencial que a estrutura metálica deve atingir na proteção catódica (NUNES, 2008). Dentre eles, destacam-se:

(a) critério de 100 mV mais negativos do que o potencial natural;

(b) aplicação de um potencial mínimo de proteção.

Na prática, o critério (b) é o mais empregado. Neste caso, para alcançar tal potencial, na proteção por corrente impressa o retificador deve ser ajustado a este novo valor de potencial. Na proteção galvânica, o potencial alcançado pela estrutura será função da diferença de potencial entre o metal a proteger e o metal usado como anodo de sacrifício.

Em geral, considera-se o valor de –800 $mV_{Ag/AgCl}$ para estruturas submersas. No entanto, algumas normas internacionais sugerem a adoção de um potencial mínimo de proteção mais negativo na presença de BRS, de –900 $mV_{Ag/AgCl}$, (BS 7361-1, 1991; ISO 15589-1, 2003; DNV-RP-B401, 2005). Segundo essas normas, em ambientes com sulfetos, seria necessária uma corrente ainda maior para proteção catódica, por isso seria necessária essa redução de potencial.

Convém ressaltar que o potencial proposto para proteção na presença de BRS ainda não apresenta base científica comprovada dependendo, portanto, de estudos investigativos que relacionem os processos eletroquímico e microbiológico.

II.9.4 - Aplicações práticas dos sistemas de proteção catódica

Atualmente todos os oleodutos e gasodutos, existentes em operação no Brasil, são protegidos catodicamente, a maior parte deles com sistemas por corrente impressa.

A grande maioria das principais adutoras de aço das Companhias de Saneamento do Brasil está também protegida catodicamente. Como principais exemplos podem-se citar os sistemas de água das cidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Vitória e Salvador.

Todas as plataformas de prospecção e produção de petróleo no mar, atualmente em operação, são também protegidas catodicamente.

Essa técnica é ainda bastante empregada em tanques de armazenamento, minerodutos, navios e píeres de atracação.

O custo total estimado para a proteção catódica nos EUA é de 2,22 bilhões de dólares por ano. Esse custo está relacionado com a instalação e operação do sistema assim como com a substituição de anodos de sacrifício corroídos (KOCH *et al.*, 2001).

De uma maneira geral, acredita-se que sistemas de proteção catódica, principalmente quando por anodos galvânicos, não

necessitam de manutenção. Essa crença é destituída de fundamento, uma vez que a proteção catódica das estruturas depende do funcionamento permanente do sistema instalado. Qualquer que seja o sistema instalado, proteção catódica por anodos galvânicos ou por corrente impressa, deve-se estabelecer um programa de acompanhamento que possibilite os ajustes quando necessário.

CAPÍTULO III

Materiais e Métodos

O presente capítulo tem como objetivo apresentar os materiais, os equipamentos e os meios/soluções utilizados nos diversos ensaios realizados neste trabalho, assim como descrever todos os procedimentos experimentais adotados.

Antes de iniciar os experimentos de proteção catódica foram feitos ensaios preliminares a fim de definir as condições em que os ensaios de proteção catódica iriam ser conduzidos.

III.1 – ENSAIOS PRELIMINARES

Nesta etapa, foi estudada a ação de BRS na corrosão do aço carbono através de curvas de polarização, perda de massa e quantificação de microrganismos. Também foi feito o estudo da associação de BRS e *Pseudomonas* tanto em condição de aerobiose quanto de anaerobiose a fim de se definir a influência do oxigênio e da participação de microrganismos produtores de exopolissacarídeos na corrosão microbiologicamente induzida.

III.1.1 – Corpos-de-prova

Foram usados cupons metálicos de aço carbono AISI 1020 devido ao seu extenso uso em instalações industriais e portuárias. Estes cupons apresentaram diferentes formatos e dimensões dependendo da finalidade do seu emprego, conforme detalhamento a seguir:

- Ensaios de perda de massa e quantificação celular - foram usados corpos-de-prova retangulares com área total de aproximadamente 14 cm^2, considerando as duas faces do cupom (Figura 14a). Estes cupons foram submetidos a um tratamento prévio consistindo do jateamento de areia para a remoção de possíveis incrustações, seguido da imersão em acetona para desengraxamento e, por fim, da secagem com jato de ar quente. Os cupons foram mantidos

em dessecador até o momento de uso, quando foram pesados ao décimo de miligrama.

● Ensaios eletroquímicos – foram usados cupons retangulares com área média de 1,5 cm^2, soldados a um fio de cobre de modo a efetuar as conexões elétricas (Figura 14b). O metal foi embutido em resina para que apenas uma de suas faces ficasse exposta. Antes do uso, os cupons foram lixados com lixas de 100 a 600, desengordurados por imersão em acetona e secos com jatos de ar quente. Em seguida, foram recobertos com camada de esmalte e mantidos em dessecador para evitar a sua oxidação. No momento da inserção dos cupons no sistema, a camada de esmalte foi retirada com acetona.

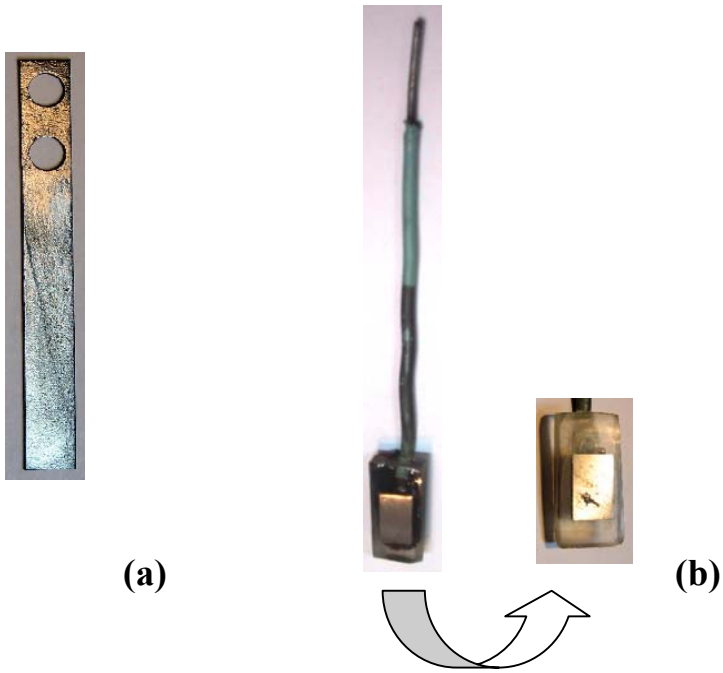


Figura 14: Corpos-de-prova usados nos ensaios: (a) perda de massa e quantificação celular e (b) eletroquímicos.

III.1.2 - Fluido de processo

Nos ensaios preliminares foi utilizada água do mar coletada na praia de Itacoatiara, região Oceânica de Niterói/RJ, tomando-se o cuidado de manter-se distante de zonas residenciais com o propósito de

garantir baixo teor de matéria orgânica e uma quantidade reduzida de microrganismos. A água foi posteriormente esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm de porosidade e armazenada em frascos estéreis à temperatura ambiente até o momento de uso. A quantidade total de água usada nos experimentos veio de uma única coleta. Antes de cada uso foram feitos testes de esterilidade através da inoculação de alíquotas em caldo nutriente (Merck No. 5443), Postgate E (POSTGATE, 1984) modificado e meio fluido ao tioglicolato (Difco 256), para a detecção de bactérias aeróbicas, redutoras de sulfato e anaeróbicas, respectivamente.

III.1.3 - Sistema

Os ensaios foram conduzidos em cubas de vidro de 1 L de capacidade, dotadas de um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e de um contra-eletrodo de aço inoxidável. As cubas foram dispostas sobre placas de agitação. Durante todo período do ensaio, o sistema foi ligeiramente agitado de modo que as células planctônicas fossem mantidas em suspensão, sem risco de ocorrer arraste dos biofilmes formados. Na Figura 15 pode ser visualizada a representação do sistema utilizado.

Figura 15: Célula usada nos ensaios preliminares.

Antes de cada experimento, a cuba foi desinfetada por imersão em solução de 6 g/L de metabissulfito de sódio. Após 24 horas de contato, foram realizadas lavagens sucessivas com água destilada estéril, para total remoção do desinfetante. Em seguida, 800 mL de água do mar estéril (item III.1.2) foram introduzidos na cuba de ensaio. Nutrientes também foram adicionados para garantir a formação de biofilmes e a viabilidade das células planctônicas e sésseis, no decorrer do período de ensaio. Com este fim foi feita uma única adição de nutrientes no início do experimento, constando de 50 mL do meio Postgate E modificado pela não adição de agar-agar e sulfato ferroso e de 50 mL de caldo nutriente.

Os corpos-de-prova foram fixados no interior da cuba através de fios de nylon (perda de massa) ou hastes de metal revestidas de plástico (ensaios eletroquímicos), paralelamente às paredes da cuba.

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar de modo a evitar contaminação.

III.1.4 - Microrganismos

Os ensaios realizados no estudo preliminar foram conduzidos na presença de diferentes culturas microbianas:

- Cultura mista enriquecida de BRS obtida a partir de cultivos sucessivos de amostra de água de um sistema de resfriamento de uma indústria petrolífera em meio Postgate E modificado (Postgate, 1984).
- Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, gentilmente cedida pelo INCQS/FIOCRUZ e mantida em ágar nutriente (Merck No. 5443).

III.1.5 - Procedimento experimental

Os ensaios foram conduzidos com o intuito de avaliar a corrosão pelas culturas microbianas consideradas os principais responsáveis

pela CMI e deste modo definir as condições para a continuidade do trabalho. Para tanto, foram realizados 3 experimentos;

- BRS em anaerobiose;
- BRS/*Pseudomonas* em aerobiose;
- BRS/*Pseudomonas* em anaerobiose;

Cada célula de ensaio (Figura 15) foi preenchida com água do mar estéril acrescida de nutrientes. As culturas foram inoculadas de modo a estabelecer uma concentração inicial de 10^8 NMP/mL. Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente e sob agitação branda.

O sistema foi projetado de modo a permitir a entrada de ar durante os ensaios. Para os ensaios conduzidos em condições de aerobiose, a abertura foi fechada com rolha de algodão hidrófobo para evitar a contaminação do sistema. Nos ensaios conduzidos em anaerobiose o fluido foi purgado com gás inerte (N_2) até reduzir a concentração de oxigênio a valor inferior a 1ppm, e a seguir vedado com rolha de borracha.

Os experimentos foram periodicamente monitorados para controle do oxigênio dissolvido. Em aerobiose, a concentração de oxigênio variou de 7,7 a 8,1 ppm. Nos experimentos realizados em anaerobiose a cada abertura do sistema para retirada de cupons eram também realizadas purgas com nitrogênio de modo a garantir um teor reduzido de oxigênio dissolvido.

O tempo total de cada experimento foi de 28 dias e, semanalmente, foram feitas análises eletroquímica (curvas de polarização), físico-químicas (perda de massa/pH) e microbiológicas (BRS/*Pseudomonas*).

Dos 9 corpos de prova inseridos no sistema para cada ensaio, quatro (Figura 14a) foram utilizados para quantificação de microrganismos sésseis (com 7, 14, 21 e 28 dias) e, após remoção do biofilme, para as determinações da perda de massa. Nas determinações eletroquímicas foram utilizados cinco cupons (Figura 14b) dispostos ao

redor do contra-eletrodo de aço inox, de tal modo a receber igualmente a corrente elétrica sobre as faces expostas. As curvas de polarização foram feitas no início do ensaio e com 7, 14, 21 e 28 dias.

Os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata a fim de garantir um desvio inferior a 10%. Todos os resultados apresentados foram expressos em valores médios.

III.1.5.1 - Quantificação celular

Os cupons, retirados assepticamente do sistema foram raspados com o auxílio de uma espátula estéril em solução redutora a fim de se obter uma suspensão celular. A partir dessa suspensão foram feitas diluições decimais sucessivas de 1 mL que foram inoculadas em meios adequados para a quantificação de cada um dos grupos microbianos.

• *Pseudomonas aeruginosa* – A quantificação desta bactéria foi feita por contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) pela técnica "pour-plate" em placas de Petri contendo gelose nutriente (Merck No. 5443). A quantificação celular foi determinada após um período de incubação de 48 horas a 30 ± 1°C.

• Bactérias redutoras de sulfato (BRS) – A quantificação deste grupo microbiano foi feita através da técnica do número mais provável (NMP) (HARRISON, 1982) em meio Postgate E modificado (POSTGATE, 1984) de composição em g/L: KH_2PO_4 0,5; NH_4Cl 1,0; $CaCl_2.6H_2O$ 1,0; $MgCl_2.7H_2O$ 2,0; NaCl 30,0; extrato de lêvedo 1,0; ácido ascórbico 0,1; $FeSO_4.7H_2O$ 0,5; agar 1,9; lactato de sódio 7 mL e solução de resazurina (0,025%) 4 mL. A condição de anaerobiose foi garantida através da purga e distribuição do meio com N_2 e vedação dos frascos tipo penicilina com rolhas de borrachas e lacres metálicos. A determinação do crescimento celular foi feita após o período de incubação de 28 dias a temperatura de 30 ± 1°C.

III.1.5.2 - Perda de massa/Taxa de corrosão

Após a remoção dos microrganismos aderidos, os cupons foram tratados, segundo Norma ASTM G1-03 (2003) que padroniza a metodologia para medidas de perda de massa em laboratório. Esse tratamento consiste na imersão dos corpos-de-prova em solução de Clark por 30 segundos. Este tempo foi definido após levantamento da curva de decapagem. A solução de Clark, consistindo de ácido clorídrico (HCl), óxido de antimônio III (Sb_2O_3) e cloreto estanhoso ($SnCl_2$), promove a decapagem do metal, isto é, elimina os produtos da corrosão aderidos à superfície. Em seguida, os cupons foram lavados com água destilada, seguida de álcool anidro e, finalmente, secos com jato de ar quente. Ao final do tratamento, os cupons foram pesados em balança analítica ao décimo de miligrama. O valor correspondente à diferença dos pesos de cada cupom antes e após os ensaios, divididos pela área total do corpo-de-prova representa a massa perdida num dado tempo.

Os resultados de perda de massa foram utilizados no cálculo da taxa de corrosão de acordo com a seguinte equação:

$$\textbf{Taxa de corrosão (mm/ano)} = \frac{\textbf{perda de massa (g) x 365 (dias/ano) x 10 (mm/cm)}}{\textbf{densidade do metal (g/cm}^3\textbf{) x área(cm}^2\textbf{) x tempo (dias)}}$$

Com o intuito de avaliar a taxa de corrosão do aço carbono durante o ensaio de perda de massa, foi adotada a Norma NACE RP-07-75 (1999) que define a intensidade do processo corrosivo.

Tabela 1: Classificação da taxa de corrosão do aço carbono

Taxa de corrosão uniforme (mm/ano)	Corrosividade
< 0,025	Baixa
0,025 a 0,120	Moderada
0,130 a 0,250	Alta
> 0,250	Severa

Fonte: Norma NACE RP-07-75

III.1.5.3 - Análises eletroquímicas

Foi utilizado o potenciostato Omnimetra modelo PG40 para o levantamento de polarização anódicas e catódicas. As curvas foram feitas através da técnica potenciocinética e a velocidade de varredura dos ensaios foi de 20 mV/min. A cada semana utilizava-se um corpo-de-prova diferente para cada polarização. Como referência foi adotado o eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e como contra-eletrodo foi utilizado o aço inoxidável.

III.2 - ENSAIOS DE PROTEÇÃO CATÓDICA

III.2.1 - Cupons metálicos

Foram usados corpos-de-prova retangulares de aço carbono AISI 1020 (Figura 16a), com área total aproximada de 12,4 cm^2 consideradas ambas as faces, que foram afixados a uma haste de aço inoxidável (Figura 16b) revestida de material isolante para possibilitar as conexões elétricas necessárias ao ensaio.

Figura 16: Corpo-de-prova usado no ensaio de proteção catódica (a) e haste de aço inox (b).

Antes do uso, os cupons foram lixados usando lixas nº 100 a 1500, desengordurados por imersão em acetona e secos com jato de ar quente de modo a obter uma superfície uniforme e livre de imperfeições que impediriam a determinação da densidade de pites (Figura 17).

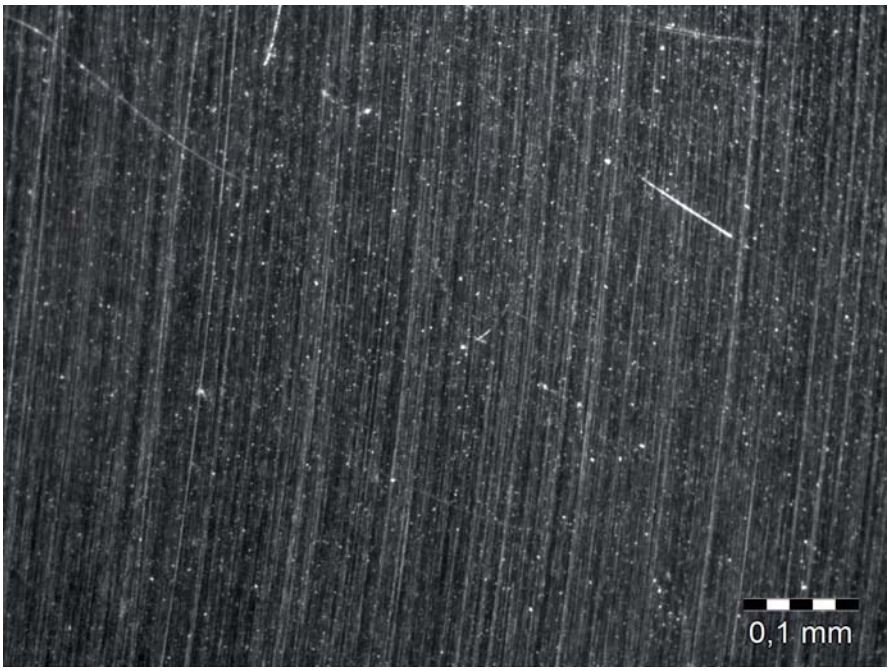


Figura 17: Superfície metálica dos corpos de prova antes do início dos ensaios.

III.2.2 - Fluido de processo

Nos experimentos conduzidos para avaliação da proteção catódica, a água do mar foi coletada na Praia da Boa Viagem, Niterói/RJ, local reconhecidamente com elevado nível de microrganismos, resultante do constante despejo de rejeitos domésticos. Essa água foi utilizada como fonte de nutrientes e de microrganismos, em função do seu conteúdo de matéria orgânica e da quantidade e diversidade da população microbiana, nela já determinadas, o que era fundamental para a execução dos experimentos. A análise microbiológica da água utilizada é apresentada na Tabela 2. A coleta foi feita durante o período de maré baixa e no mesmo dia do início do experimento tanto para minimizar as variações das características microbiológicas e químicas, quanto para manter a integridade da microbiota indígena posto que o estudo tinha como meta estabelecer o efeito de diferentes potenciais sobre população séssil de BRS, em condições ambientais. Portanto, a presença de uma microbiota indígena era fundamental.

Tabela 2: Análise microbiológica da água do mar utilizada

ANÁLISE	CONCENTRAÇÃO CELULAR
Bactérias Aeróbias (ufc/mL)	$6,86 \times 10^5$
Bactérias produtoras de ácido (NMP/mL)	$3,10 \times 10^3$
BRS (células/mL)	$2,50 \times 10^1$

ufc – unidades formadoras de colônia

Os resultados foram expressos em valores médios de 5 determinações.

III.2.3 – Sistema

Foi utilizada a mesma célula do ensaio anterior (item III.1.3) previamente esterilizada conforme descrito. Os ensaios foram

conduzidos com 800 mL de água do mar "in natura". Para cada ensaio foram inseridos 4 corpos-de-prova idênticos (Figura 16a) no sistema: dois para serem acoplados ao potenciostato e, portanto, protegidos catodicamente, enquanto os demais permaneciam sem nenhuma proteção para fins comparativos. Um eletrodo de referência de Ag/AgCl e um contra-eletrodo de platina também foram inseridos ao sistema (Figura 18A(I)). Foi adicionada alíquota de um cultivo de células ativas de BRS de 3 dias a fim de estabelecer concentração inicial de aproximadamente 10^8 células/mL.

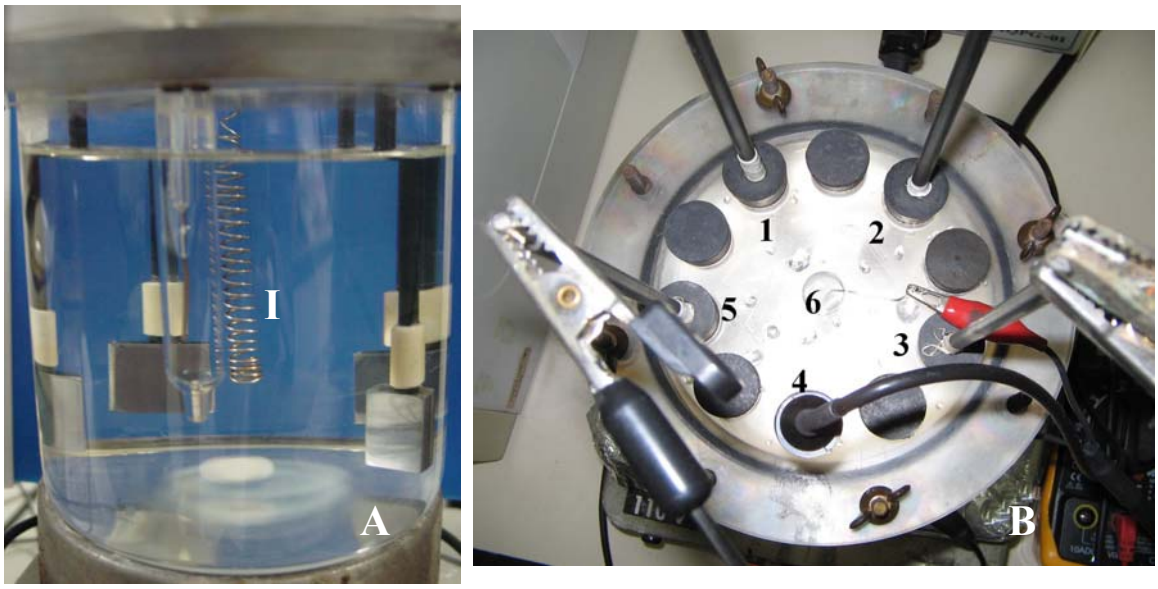


Figura 18: Sistema utilizado nos ensaios de proteção catódica. A) célula de ensaio, (I) Contra-eletrodo de platina; B) Disposição dos eletrodos na célula de ensaio: 1 e 2 – Corpos-de-prova sem proteção catódica, 3 e 5 – Corpos-de-prova protegidos catodicamente, 4 – Eletrodo de Referência e 6 – Contra-eletrodo.

A corrente necessária para fixação do potencial foi dada através do Potenciostato Microquímica MQPG-01 conectado a um computador (Figura 19). O potencial aplicado foi medido com Multímetro (Minipa Et 20 33) através do eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.

Figura 19: Célula eletroquímica conectada ao potenciostato e ao computador.

III.2.4 – Procedimento experimental

Nesta etapa os cupons metálicos foram polarizados em três diferentes potenciais na presença e ausência de microrganismos a saber:

- -800 mV $_{Ag/AgCl}$ – valor admitido na prática para proteção de estruturas metálicas;
- -900 mV $_{Ag/AgCl}$ - potencial empregado na presença de BRS;
- -1000 mV $_{Ag/AgCl}$ – esse valor foi empregado a fim de simular um caso de superproteção.

Para fins comparativos foram realizados ensaios controles simultaneamente sem proteção catódica, com e sem a presença de microrganismos:

- Controle biótico I: cupom inserido na célula com microrganismos (-800 mV) não polarizado;

- Controle biótico II: cupom inserido na célula com microrganismos (-900 mV) não polarizado;

- Controle biótico III: cupom inserido na célula com microrganismos (-1000 mV) não polarizado;

- Controle abiótico I: cupom inserido na célula sem microrganismos (-800 mV) não polarizado;

- Controle abiótico II: cupom inserido na célula sem microrganismos (-900 mV) não polarizado;

- Controle abiótico III: cupom inserido na célula sem microrganismos (-1000 mV) não polarizado;

Os sistemas foram conduzidos em aerobiose, à temperatura ambiente e sob agitação magnética branda. O tempo total de cada experimento foi de 7 dias, quando foram feitas as quantificações celulares (BRS, bactérias heterotróficas aeróbicas totais e produtoras de ácido), as análises de perda de massa, quantificação de exopolissacarídeos, atividade hidrogenásica e as determinações de pites (inspeção visual e medida da profundidade).

III.2.4.1 - Quantificação celular

Nos ensaios de proteção catódica foi adotada a mesma metodologia descrita para remoção dos biofilmes dos cupons metálicos (item III.1.5.1). Porém, tanto os cupons que estavam sob proteção quanto os que não estavam foram raspados em tampão fosfato 10mM (pH 7,0) estéril purgado com N_2. Foi utilizado o tampão ao invés da solução redutora a fim de que a determinação de exopolissacarídeo do biofilme fosse possível. Neste ensaio, além das BRS foram quantificadas:

- Bactérias aeróbias heterotróficas – a mesma metodologia descrita para quantificação *P. aeruginosa* (item III.1.5.1).

• Bactérias produtoras de ácido - A determinação foi feita através do NMP em meio vermelho de fenol acrescido de 1% de glicose e 3% de NaCl (Merck, No. 1109870500), em aerobiose. A quantificação celular foi determinada após um período de incubação de 14 dias a 30ºC.

III.2.4.2 - Perda de massa/Taxa de corrosão

Após a remoção dos microrganismos aderidos, os cupons foram retirados das hastes e tratados conforme procedimento descrito no item III.1.5.2. Neste item é indicada a metodologia para determinação da perda de massa e da taxa de corrosão. Os valores obtidos são uma média aritmética da perda de massa dos dois cupons.

III.2.4.3 - Atividade hidrogenásica

O teste foi realizado conforme descrito por Iverson (1966). Por este método, a detecção da atividade hidrogenásica de BRS se dá pelo aparecimento da coloração azul característica da redução do corante metil viologen em função da liberação de elétrons que resultam do consumo de hidrogênio molecular adsorvido na superfície do cupom metálico.

III.2.4.4 - Dosagem de exopolissacarídeo (EPS)

Para analisar o teor de EPS presente no biofilme, 10 mL da suspensão celular obtida através da raspagem da superfície metálica em solução tampão fosfato 10mM (pH 7,0) foi filtrada em membrana de éster celulose (Millipore) com tamanho de poro de 0,22 µm, utilizando um aparato de filtração a vácuo da Millipore.

A membrana com as células foi transferida para uma placa de Petri limpa. As células eram cuidadosamente raspadas da superfície da membrana com uma espátula e ressuspensas em 4,0 mL de EDTA-Na 1mM dissolvido no mesmo tampão. A mistura permanecia em repouso por 2 horas à temperatura de 4ºC. Após este período, esta era filtrada em filtros Millex (Millipore) com tamanho de poro de 0,22 μm para retenção das células e de fragmentos celulares. O filtrado era armazenado sob refrigeração e posteriormente utilizado para análise de polissacarídeo ligado às células aderidas pelo método de Dubois *et al* (1956), conforme descrito por Cammarota, 1998.

III.2.4.5 - Avaliação da corrosão por pite

Após raspagem para remoção dos biofilmes, os cupons foram analisados quanto à presença de pites. Foram feitas as análises de densidade e profundidade de acordo com a Norma ASTM G 46/94 (2005).

A inspeção visual da presença e distribuição dos pites ao longo da superfície metálica corroída foi feita em estereoscópio (marca Carl Zeiss, modelo Stemi 200-C), em aumento de 20X, sob condições adequadas de iluminação incidente. A densidade de pites foi calculada a partir da relação número total de pites, visualizados em ambas as faces do corpo-de-prova, pela área total expressa em metros quadrados.

A profundidade dos pites foi determinada também com o auxílio do estereoscópio, em aumento de 50X, utilizando programa que correlaciona a diferença entre as leituras de foco do ajuste fino da superfície do metal e da base do pite.

CAPÍTULO IV

Resultados e Discussão

IV.1 – ENSAIOS PRELIMINARES

Nesse estudo foi feita a determinação da influência das BRS na corrosão microbiologicamente induzida de aço carbono AISI 1020, em sistemas conduzidos em aerobiose e anaerobiose, na presença e ausência de bactérias produtoras de material polimérico extracelular (EPS). O propósito deste estudo era definir as condições a serem adotadas nos ensaios de proteção catódica. Para determinar a efetividade deste método no controle da CMI era fundamental estabelecer as condições mais drásticas, ou seja, mais favoráveis para a atividade metabólica de BRS sésseis, considerados como os principais responsáveis pela degradação de materiais.

Os resultados serão apresentados em blocos, conforme os parâmetros monitorados a fim de facilitar a análise.

IV.1.1 - Monitoramento microbiológico

A Figura 20 apresenta a colonização dos cupons expostos à água do mar na presença apenas de BRS planctônicas (população inicial de 10^8 NMP/mL), em condição de anaerobiose (cerca de 1% de O_2 dissolvido). Decorridos sete dias, foi evidenciado um número considerável de BRS no biofilme formado, de 5,1 x 10^5 NMP/cm^2. Esse resultado demonstra a capacidade das células planctônicas de BRS em aderir e colonizar superfícies sólidas, desde que as condições de cultivo sejam propícias.

Em geral, o número de microrganismos presentes em biofilmes recém formados está correlacionado à concentração dos respectivos microrganismos na fase planctônica (FASSARELA *et al.*, 2007; SOUZA, SÉRVULO e FRANÇA, 2005). Com relação especificamente as BRS, foram encontrados valores na literatura variando de 10^3 a 10^5 NMP/cm^2 em biofilmes formados sobre cupons de aço carbono expostos à água do mar, contendo altos teores de matéria orgânica e células microbianas, devido à contaminação freqüente de despejos domésticos e industriais

(GONÇALVES, SÉRVULO e FRANÇA, 2003; TORRES, 2001). Nestes trabalhos a quantidade de BRS na fase planctônica era baixa, 10^2-10^3 NMP/mL, porém estavam associadas a várias outras espécies microbianas, dentre elas as bactérias formadoras de exopolissacarídeos. Essa característica é normalmente atribuída às bactérias do gênero *Pseudomonas*.

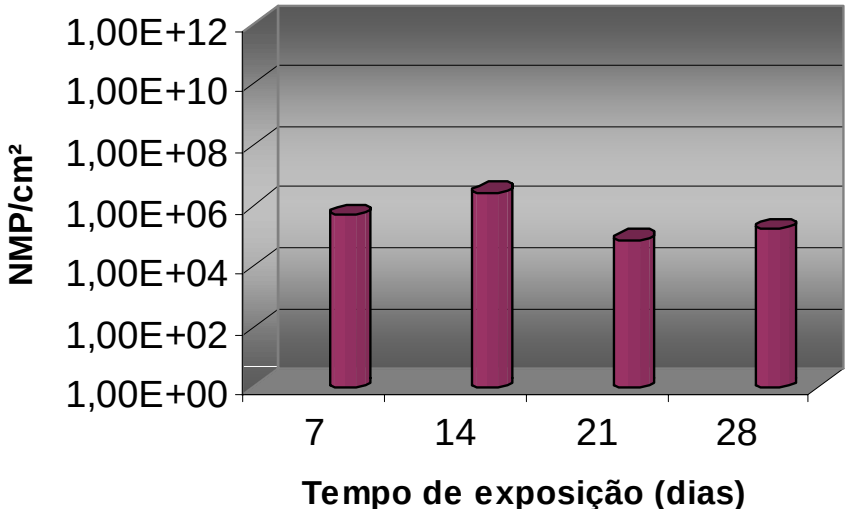


Figura 20: Colonização da superfície de aço carbono AISI 1020 por BRS.

No presente trabalho, o número de BRS sésseis confirma a capacidade de espécies deste grupo microbiano em aderir a superfícies sólidas. A aderência provavelmente ocorre via material polimérico extracelular já que, conforme evidenciado por vários autores, algumas espécies de BRS produzem EPS (CHAN, XU & FANG, 2002; PÉREZ *et al.*, 2007).

Zinkevih *et al.* (1996) caracterizaram os exopolímeros produzidos por duas distintas linhagens de BRS, tanto na fase planctônica quanto em produtos de corrosão severa removidos da superfície de aço carbono, em água do mar enriquecida com os constituintes do meio Postgate C, a 37°C. Segundo os autores, a composição dos materiais poliméricos sintetizados pelas culturas planctônicas foi similar, apresentando polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Por outro lado, o EPS nos biofilmes apresentou composição diferenciada, variando

em rendimento e em composição de açúcares e aminoácidos, indicando que o tipo de metal e as condições do ambiente regulam a fisiologia destes microrganismos influenciando na sua resposta à interação com o habitat.

No período monitorado, a população séssil de BRS apresentou valores máximo e mínimo de 2,6 x 10^6 e 7,3 x 10^4 NMP/cm² respectivamente; não se verificando uma tendência definida de aumento ou decréscimo. Similarmente, a população de BRS na fase planctônica se manteve praticamente constante ao longo de todo o período monitorado. Estes resultados sugerem que as populações de BRS presentes atingiram uma condição desfavorável, quer por estarvação nutricional quer por inibição aos produtos gerados durante seu metabolismo, que induziram um estado de latência. Vários estudos já comprovaram a capacidade das BRS de permanecer em estado latente por períodos prolongados, proliferando ao encontrar ambiente apropriado (POSTGATE, 1984; BARTON, 1995).

A geração de sulfeto pode ter concorrido para a inibição das BRS, visto que ocorreu o enegrecimento intenso do fluido no 14° dia de ensaio, característico da formação de sulfeto ferroso (Figura 21).

Figura 21: Célula de ensaio após 14 dias do experimento com BRS em anaerobiose.

A toxicidade das células de BRS ao H_2S é dependente do seu estado de dissociação, ou seja, está relacionado ao valor de pH. A toxicidade do sulfeto decorre da sua difusão passiva pela membrana celular, desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, enzimas por ligação cruzada e pela alteração do pH intracelular.

Na literatura é mencionada a inibição de *Desulfovibrio* sp. por concentrações de H_2S em torno de 550 e 250 mg/L para valores de pH de 6,2-6,6 e 7,0, respectivamente (REISS *et al.*, 1991). Segundo estes autores, o crescimento é diretamente proporcional à concentração de H_2S até o seu valor inibitório, quando ocorre redução no número de células em velocidade similar a do crescimento.

Também se deve mencionar que a formação de um biofilme é um sistema dinâmico, que envolve um equilíbrio entre o crescimento celular e o arraste de microrganismos do biofilme que, por sua vez, é conseqüência do aumento da sua espessura e da velocidade do fluido (COSTERTON, 1995). O acúmulo de células no biofilme é dependente da atividade metabólica e, portanto, da disponibilidade de nutrientes, presença e quantidade de metabólitos tóxicos e das condições físicas (pH, O_2, ...).

A Figuras 22 (A e B) mostram a variação das populações sésseis de BRS e *Pseudomonas* para os ensaios conduzidos com a associação das duas culturas bacterianas, para alto e baixo teor de O_2 dissolvido, respectivamente. Em ambas as condições de disponibilidade de oxigênio foram determinadas quantidades de BRS em 7 dias superiores a quantificação feita no ensaio apenas com BRS (Figura 20). A associação das culturas microbianas particularmente, em aerobiose, foi a mais adequada para o desenvolvimento das BRS, apesar destas bactérias serem aerotolerantes. A disponibilidade de oxigênio provavelmente propiciou a produção mais intensa de EPS pela bactéria *Pseudomonas,* criando condições nutricional e física favoráveis à atividade das BRS.

Torres e de França (2002) também observaram que o número de BRS em biofilmes formados sobre cupons de aço carbono expostos à água do mar foi diretamente proporcional à concentração de oxigênio presente. Os autores também apontam como justificativa a produção mais intensa de EPS pelo metabolismo aeróbio da espécie P*seudomonas*, em função da maior quantidade de energia gerada nesta condição.

A colonização das superfícies metálicas também foi diferenciada em função da disponibilidade de oxigênio (Figura 22). Em aerobiose, no 14° dia foi determinada a elevação do número de BRS sésseis em 2 ordens de grandeza; este valor se manteve inalterado até o fim do monitoramento (Figura 22A). Distintamente, em teor reduzido de oxigênio, houve um decréscimo da população séssil de BRS, embora a partir do 14° dia não tenha sido mais detectada qualquer variação (Figura 22B). Estes resultados dão suporte à teoria anteriormente levantada de que houve interrupção do metabolismo das células de BRS, por exemplo, por um dos motivos então sugerido, sem contudo impedir a sua sobrevivência.

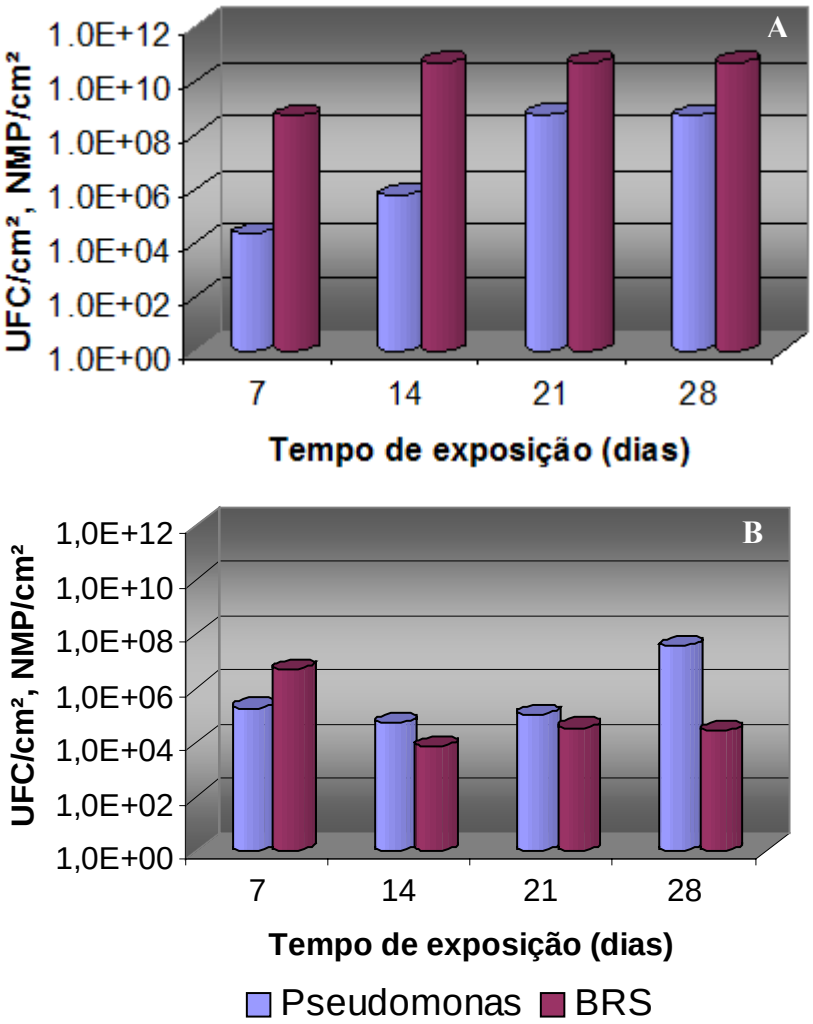


Figura 22: Variação da população de microrganismos sésseis nos ensaios com associação de BRS e *Pseudomonas* (A- em aerobiose; B- em anaerobiose).

Em condição de aerobiose, a população séssil de *Pseudomonas* apresentou perfil semelhante ao de BRS, embora seu número tenha sido sempre menor (Figura 22A). O máximo de células foi determinado no 21° dia de ensaio, com posterior equilíbrio. As células de *Pseudomonas* demoraram um pouco mais para atingir o seu valor máximo, que foi duas ordens de grandeza inferior ao detectado para as BRS. Entretanto, em reduzida concentração de oxigênio dissolvido, a concentração celular determinada para *Pseudomonas* nos biofilmes permaneceu praticamente constante por 21 dias, apresentando elevação em duas ordens de grandeza ao final do período.

O lento crescimento de *Pseudomonas* no biofilme pode ser explicado pela baixa disponibilidade de oxigênio, induzindo o metabolismo anaeróbio que gera pouca energia e, conseqüentemente, pouca síntese de componentes celulares (FILIATRAULT *et al.*, 2006). Por sua vez, o metabolismo das BRS parece depender da atividade de outros microrganismos, mesmo que a condição de anaerobiose já tenha sido estabelecida, em termos nutricionais. Deve ser considerado ainda que os nutrientes só foram adicionados uma única vez no início do processo, logo seu esgotamento do sistema é mais rápido em condição de aerobiose, posto que promove maior produção de energia e síntese de material celular.

IV.1.2 - Perda de massa dos cupons de aço-carbono

Os valores correspondentes às perdas de massa dos cupons de aço carbono AISI 1020, nas diferentes condições estudadas, estão apresentados na Figura 23.

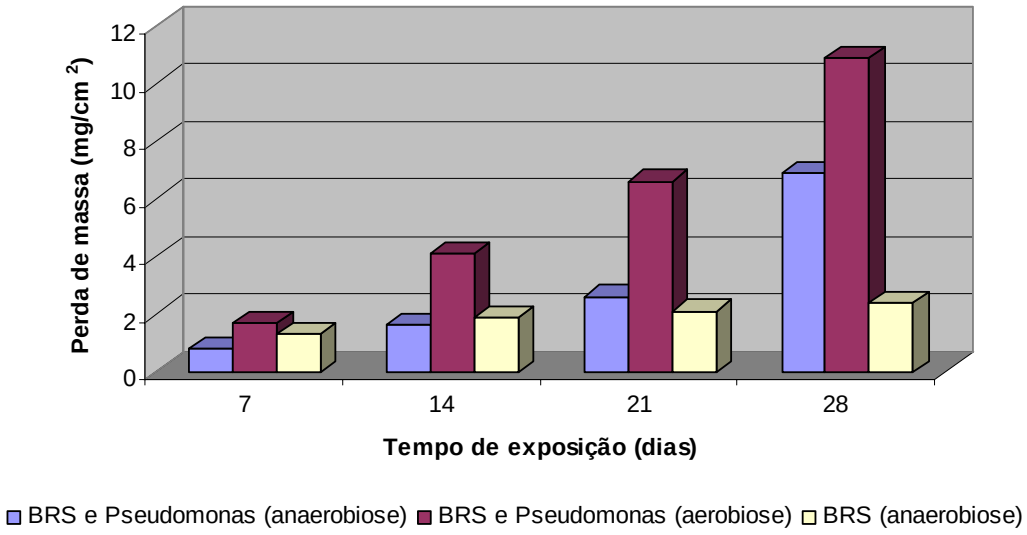


Figura 23: Variação da perda de massa ao longo dos experimentos.

Analisando a figura pode-se observar que os ensaios realizados com a associação de *Pseudomonas* e BRS, quer em aerobiose quer em anaerobiose, apresentaram aumento da perda de massa diretamente proporcional ao tempo de exposição. No entanto, a maior perda de massa foi determinada em condição de aerobiose. Este comportamento pode ser atribuído a diferentes efeitos, de forma independente ou mesmo associada, como: elevado número de BRS sésseis, maior atividade de *Pseudomonas*, presença de oxigênio e, inclusive, ao tipo de metal.

Como já mencionado, a atividade metabólica intensa de BRS resulta na geração de metabólitos agressivos, especialmente grande quantidade de sulfeto, um agente comprovadamente corrosivo. No caso da produção de exopolissacarídeos pode haver intensificação da corrosão pela geração de células de aeração diferencial sobre a superfície metálica, sobretudo quanto maior a concentração de oxigênio no fluido. Além disso, o oxigênio pode comportar-se como acelerador do processo eletroquímico de corrosão (GENTIL, 2003).

Em soluções não-aeradas, a reação catódica se processa com velocidade pequena, sendo conseqüentemente o processo anódico

também lento. Neste caso, o hidrogênio molecular, produto da reação catódica de redução da água, pode ficar adsorvido na superfície do catodo, polarizando a pilha formada com conseqüente redução do processo corrosivo. Entretanto, na presença de oxigênio, este se reduz preferencialmente comprometendo a polarização da superfície metálica pelo hidrogênio, acelerando o processo corrosivo, conforme detalhado no item II.9.2 (eq. 1 e 2).

O aço carbono devido ao seu menor custo comparativamente ao das outras ligas, vêm sendo muito empregado nos mais diversos setores industriais. No entanto, este material apresenta baixa resistência à ação corrosiva, em especial quando em contato com a água do mar.

A água do mar é considerada a mais corrosiva por apresentar elevada salinidade. O efeito do cloreto de sódio nos processos corrosivos deve-se ao fato deste sal ser um eletrólito forte elevando portanto, a condutividade da solução eletrolítica. Em águas com baixa condutividade, o anodo e o catodo estão muito próximos e, consequentemente, os íons gerados nas regiões anódicas e catódicas formam um produto de corrosão compacto e aderente à superfície metálica constituindo um filme protetor. Em águas salgadas, ou seja, de elevada condutividade, anodo e catodo tendem a se distanciar e portanto há formação do produto de corrosão longe da superfície metálica resultando em um depósito poroso pouco efetivo como barreira protetora (HAMILTON, 1995).

Note-se ainda que no ensaio com a associação das duas culturas microbianas em anaerobiose houve um aumento considerável da perda de massa no 28º dia de ensaio, possivelmente devido à maior adesão de *Pseudomonas* verificada neste dia (Figura 22B). Provavelmente o maior número de *Pseudomonas* em contato com o metal além da criação de células de aeração diferencial levou a uma maior corrosão uma vez que essas bactérias produzem ácidos que podem atacar a superfície metálica. De acordo com Beech (2000), *Pseudomonas aeruginosa* produz

polissacarídeos extracelulares ácidos como o ácido algínico durante a colonização de superfícies metálicas.

De acordo com a Figura 23, comparativamente as perdas de massa dos experimentos com BRS em anaerobiose foram inferiores às determinadas nas outras condições avaliadas. Provavelmente, isto se deveu à formação de um filme de FeS que atuou como uma barreira protegendo a superfície metálica do contato com o íon cloreto (MA *et al.*, 2000).

A corrosividade dos sulfetos dissolvidos está intimamente relacionada com a concentração de sulfetos e o pH. Para concentrações superiores a, aproximadamente 515 ppm, Shannon e Boggs (1975) observaram a formação de camadas duras e aderentes de sulfeto de ferro na superfície do aço. Estas camadas conferiram uma proteção relativa ao metal base. Quando as concentrações de sulfeto eram baixas, o sulfeto de ferro produzido era não-aderente e gelatinoso conferindo pequena ou nenhuma proteção.

Os dados de perda de massa foram usados para cálculo das taxas de corrosão em cada um dos casos estudados (Tabela 3). A taxa de corrosão em apenas 14 dias de exposição do material ao meio com a associação das duas culturas microbianas na presença de oxigênio pôde ser classificada como alta.

A análise dos dados apresentados na Tabela 3 também permite concluir que, na presença de ambas as culturas de microrganismos, a corrosão é classificada como alta, independente do teor de oxigênio. Neste caso, o oxigênio só contribui para aceleração do processo. Contudo, as BRS individualmente não interferem no processo corrosivo, pelo contrário, já que se evidencia uma redução da taxa de corrosão do aço carbono em função do tempo.

Portanto, pode-se estabelecer que os microrganismos efetivamente intensificam o processo corrosivo, sendo que a presença de diferentes espécies microbianas no biofilme, por conta dos produtos gerados e da

sua interrelação nesta estrutura, compromete severamente a vida útil do aço carbono.

Tabela 3: Taxas de corrosão e classificação do processo corrosivo correspondente para os diferentes ensaios realizados

Tempo (dias)	AEROBIOSE		ANAEROBIOSE			
	BRS e *Pseudomonas*		BRS e *Pseudomonas*		BRS	
	Taxa (mm/ano)	Corrosão*	Taxa (mm/ano)	Corrosão	Taxa (mm/ano)	Corrosão
7	0.113	moderada	0.053	moderada	0.088	moderada
14	0.137	alta	0.054	moderada	0.063	moderada
21	0.148	alta	0.058	moderada	0.047	moderada
28	0.182	alta	0.165	alta	0.040	moderada

*determinada a partir da classificação NACE

IV.1.3 – Análises eletroquímicas

As curvas de polarização anódicas e catódicas obtidas ao longo dos ensaios foram representadas em gráficos relacionando o potencial aplicado versus a densidade de corrente (Figuras 24 a 26). Vale lembrar que quando os microrganismos estão presentes eles modificam as reações, apresentando uma interação dinâmica, sendo difícil saber ao certo os tipos de reações que estão ocorrendo na superfície metálica no decorrer do tempo. Por isso, não é possível analisar as curvas caso a caso.

As curvas anódicas mostraram que o aço carbono apresentou dissolução ativa em todos os ensaios realizados, ou seja, nenhum domínio de passivação ocorreu na faixa de polarização realizada.

No ensaio realizado apenas com BRS em anaerobiose (Figura 24) apenas a curva anódica do tempo 0 foi diferente, uma vez que as outras tendiam a uma mesma densidade de corrente limite. Do mesmo modo, a curva catódica do início do experimento também foi diferente das demais. Neste caso, observa-se um aumento da densidade de corrente

com o crescimento das BRS. Outra observação é que o potencial de corrosão se torna mais catódico na presença dessas bactérias, característico de meios mais redutores.

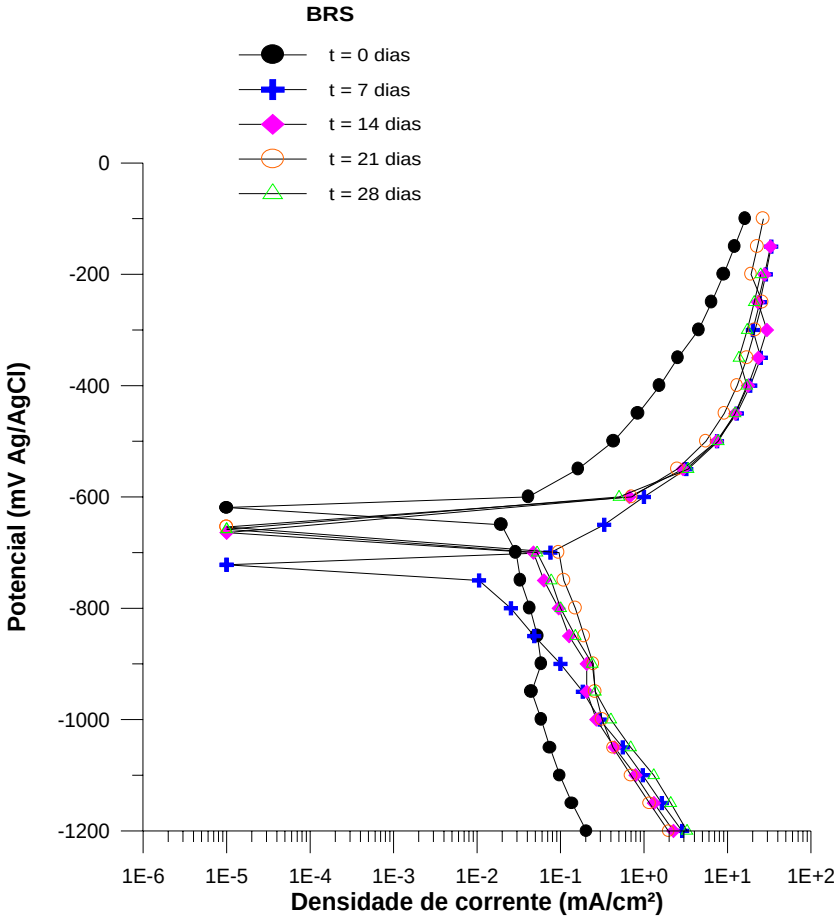


Figura 24: Curvas de polarização para o ensaio conduzido com BRS em anaerobiose.

As curvas anódicas do ensaio com BRS e *Pseudomonas* em aerobiose (Figura 25), tiveram comportamento semelhante e não se observa, como no caso de BRS em anaerobiose, aumento da densidade de corrente com o crescimento dos microrganismos. No entanto, as curvas catódicas apresentaram valores de densidade de corrente diferentes, chegando a variar em até uma ordem de grandeza após o início do crescimento dos microrganismos. Neste caso, observa-se que há variação da densidade de corrente para valores mais elevados. O

potencial de corrosão praticamente não sofreu alteração com exceção somente da medida após 14 dias de ensaio.

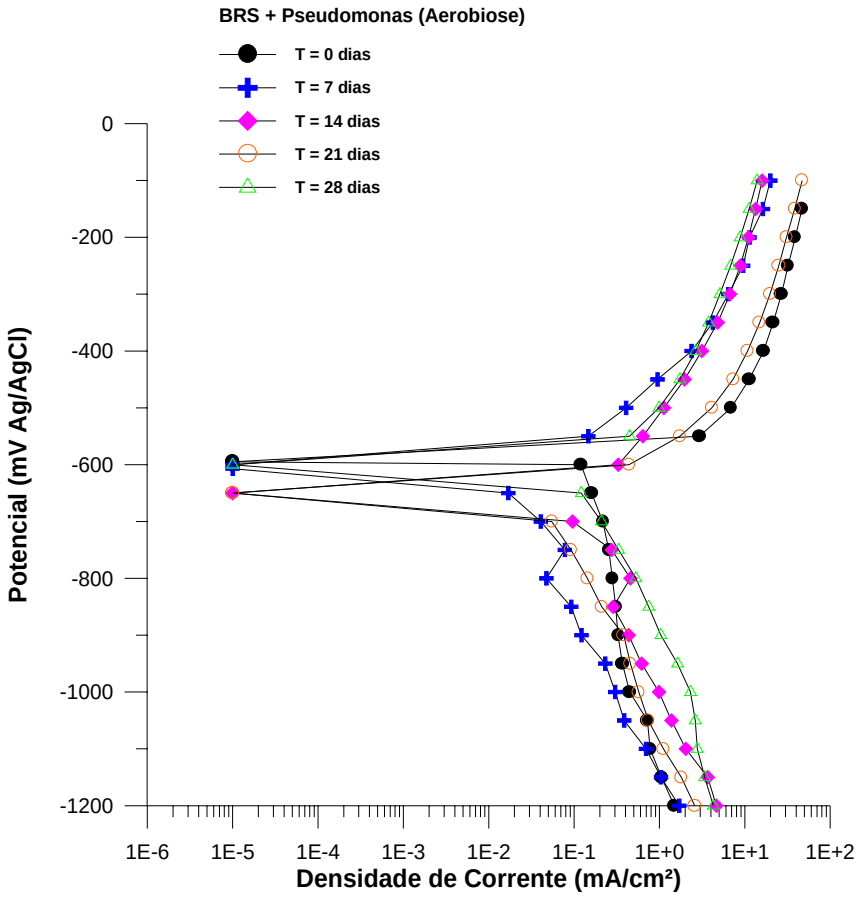


Figura 25: Curvas de polarização para o ensaio na presença de BRS e *Pseudomonas* em aerobiose.

As curvas anódicas obtidas do ensaio com BRS e *Pseudomonas* em anaerobiose (Figura 26) praticamente não variaram sendo observada a tendência ao mesmo valor de densidade de corrente anódica. Já para as curvas catódicas foi observado um aumento de densidade de corrente para um mesmo potencial, tal qual observado para a associação de BRS e *Pseudomonas* em aerobiose, após o início do crescimento microbiano.

Comparando ainda as condições de aerobiose e anaerobiose (associação de BRS e *Pseudomonas*), observa-se uma ligeira elevação da

faixa de variação da densidade de corrente catódica no caso de aerobiose, compatível com a presença de oxigênio.

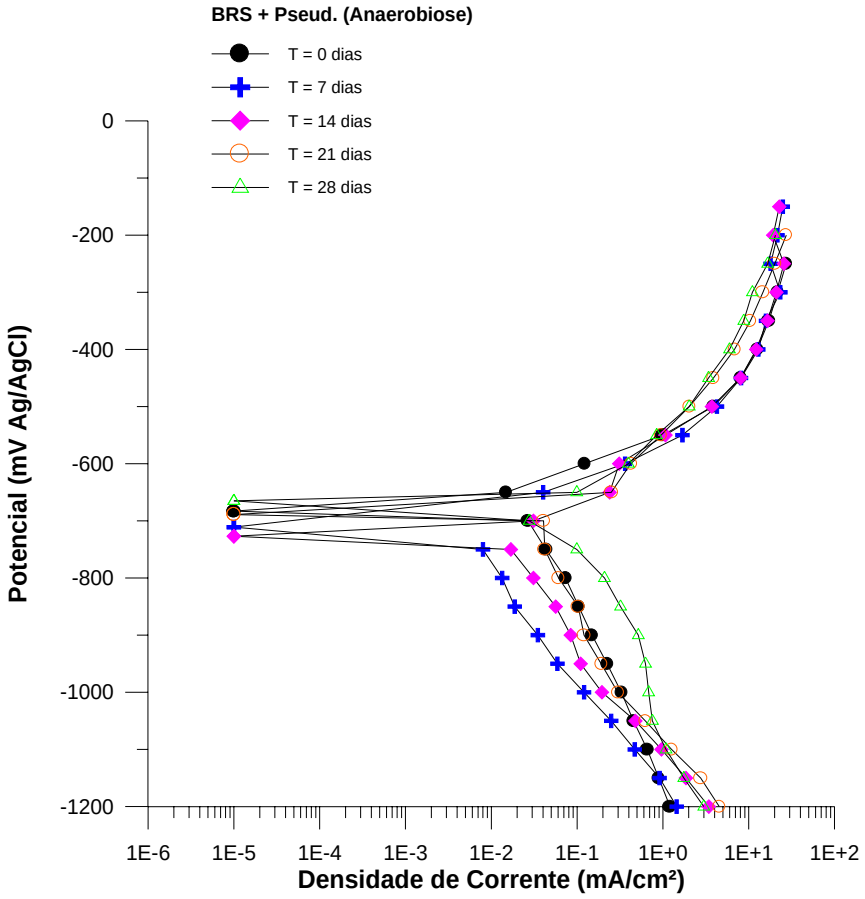


Figura 26: Curvas de polarização para o ensaio na presença de BRS e *Pseudomonas* em anaerobiose.

Conforme pode ser constatado, a condição mais agressiva para os corpos-de-prova foi obtida na presença de BRS e *Pseudomonas* em ambiente aerado. Esses resultados corroboram os de perda de massa e da formação do biofilme. Nota-se também que para proteção catódica deste sistema, na pior condição (28 dias) haveria necessidade de uma maior densidade de corrente a ser aplicada de 1,03 mA/cm^2 para potencial de –900 mV, o que elevaria sobremodo os custos operacionais se comparado ao caso onde somente BRS está presente. Neste caso, de acordo com as curvas levantadas, a densidade de corrente seria muito

inferior, de 0,24 mA/cm² para o mesmo potencial. Resultado que também confirma os dados de perda de massa.

Assim, analisando esses resultados, pode-se verificar a variação da densidade de corrente de proteção catódica quando se admite a presença de elevada concentração da microbiota indígena, que é constituída por espécies sabidamente responsáveis por induzir o processo de corrosão. A presença de oxigênio também foi considerada por sua efetiva contribuição na formação de EPS, acelerando a corrosão do metal. Ficou ainda definida a importância de elevar o número de BRS a fim de avaliar a influência da proteção catódica, já que segundo os pesquisadores é devido a sua presença a necessidade de alterar o potencial empregado de –800 mV para –900 mV.

IV.2 - ENSAIOS DE PROTEÇÃO CATÓDICA

A formação de biofilmes sobre cupons de aço-carbono foi acompanhada em 3 diferentes potenciais de proteção catódica (Figura 27).

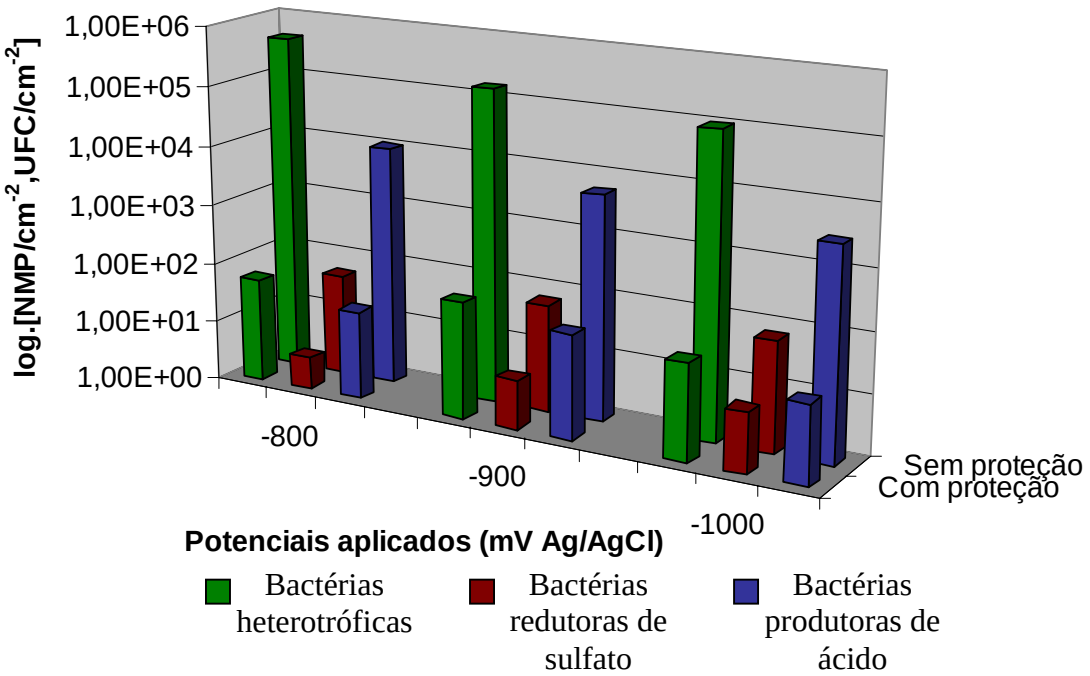


Figura 27: Número de microrganismos sésseis nos biofilmes formados sobre aço carbono sem e com aplicação da proteção catódica, em 3 diferentes potenciais.

Pode-se notar que o número inicial de células presentes na água do mar permitiu a formação de biofilmes em todas as condições estudadas. Contudo, o número de bactérias aderidas aos cupons que estavam sob proteção catódica foi inferior ao obtido para os cupons que não estavam sob proteção, para todas as condições testadas.

A formação de uma camada de produto de corrosão sobre o metal fornece aos microrganismos locais perfeitos para a sua fixação, aumentando assim, a quantidade de biofilme na superfície metálica (GUEZENNEC, 1991). Conforme pode ser observado na Figura 28, os corpos-de-prova que não estavam sob proteção apresentaram uma densa camada de produtos de corrosão aderente, nas condições do teste. Entretanto, os cupons protegidos permaneceram praticamente com o mesmo aspecto de quando foram inseridos no sistema. Superfícies com elevada rugosidade, apresentando imperfeições ou com produtos de corrosão podem ser mais suscetíveis à formação do biofilme do que superfícies bem polidas. As microrrugosidades protegem as células adsorvidas das forças de cisalhamento, reduzindo as taxas de dessorção. Além disso, favorecem a adsorção microbiana na medida em que aumentam a área superficial disponível para adsorção (CHARACKLIS, 1990).

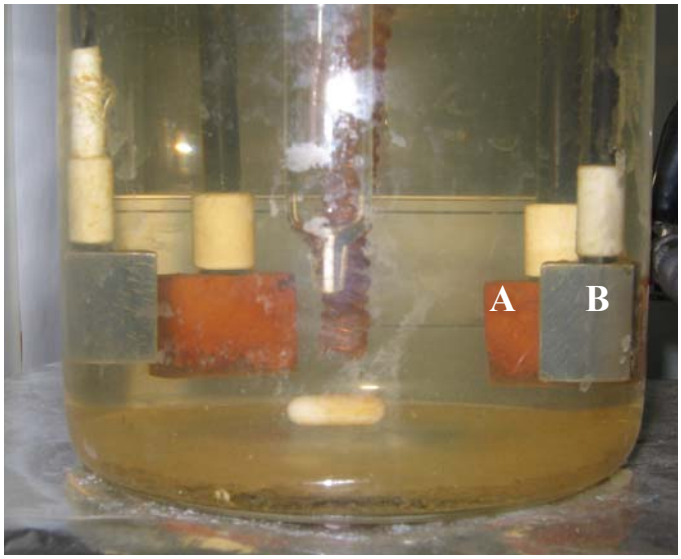


Figura 28: Célula de ensaio após 7 dias de experimento (A- sem proteção catódica; B- polarizado a -900 mV).

A adesão de microrganismos a uma superfície também é influenciada por interações eletrostáticas (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987). Uma superfície protegida catodicamente é uma região carregada negativamente e, portanto, repele qualquer partícula de carga negativa (item II.9.2 equações 1 e 2). Broedelius e Vandamme (1987) afirmam que, apesar da natureza complexa da parede celular, os microrganismos são negativamente carregados sob condições normais. E, no caso das células que apresentam biopolímeros externamente à parede celular, tem-se uma ampla distribuição de cargas negativas uma vez que são constituídos principalmente de polissacarídeos. Assim, a célula bacteriana é eletrostaticamente repelida da superfície catódica (EDYVEAN *et al.*, 1992). Contudo, mesmo aceitando a repulsão eletrostática das células como inibitória à colonização microbiana das superfícies, é notória a capacidade de adesão das bactérias a superfícies carregadas negativamente através da ligação com cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} (COSTERTON *et al.*, 1995). Assim, é possível explicar o menor número de microrganismos determinados nos ensaios onde as superfícies metálicas foram protegidas catodicamente (Figura 27).

A análise da Figura 27 permite estabelecer a efetividade da proteção catódica no controle do crescimento de bactérias aeróbias em estruturas de aço carbono imersas em água do mar. O número de bactérias heterotróficas totais e de bactérias produtoras de ácido sobre os cupons protegidos foi bem inferior ao dos cupons não protegidos nos três potenciais estudados. Outros autores também mostraram que a proteção catódica reduz a adesão e reprodução de bactérias aeróbias durante os primeiros estágios da exposição e que o grau dessa redução depende da densidade de corrente aplicada (EDYVEAN, 1984; DE MELE, 1993 e VIDELA, 1994). Provavelmente a adesão de bactérias aeróbias é limitada pela produção de hidrogênio catódico e redução do oxigênio na superfície protegida (item II.9.2 equações 1 e 2).

Assim como observado para as bactérias aeróbias, o número de BRS aderidas aos cupons protegidos foi inferior aos cupons não

protegidos. Isso provavelmente se deve ao fato de os cupons não protegidos apresentarem maior número de bactérias heterotróficas totais e produtoras de ácido aderidas. Essas bactérias podem favorecer o crescimento das BRS tanto pela produção de exopolissacarídeos, estabelecendo uma condição de anaerobiose na base do biofilme quanto pela produção de ácidos orgânicos de cadeia curta que podem ser metabolizados pelas BRS.

Contudo, ao contrário do evidenciado para os demais microrganismos monitorados, a redução do potencial de proteção catódica parece ter levemente favorecido o crescimento das BRS, provavelmente devido ao aumento da redução do oxigênio, o que favorece condições de anaerobiose abaixo dos depósitos. Além disso, o hidrogênio catódico produzido pode ter estimulado o crescimento de bactérias com capacidade de síntese da enzima hidrogenase, como é o caso de algumas espécies de BRS.

A fim de validar tal hipótese, a atividade da enzima hidrogenase foi determinada nos biofilmes formados sobre os cupons polarizados nos diferentes potenciais e nos controles, utilizando o corante metil viologen como aceptor final de elétrons. Conforme pode ser observado na Figura 29, na ausência de bactérias hidrogenase positivas não houve formação da coloração azul, indicativa da atividade hidrogenásica.

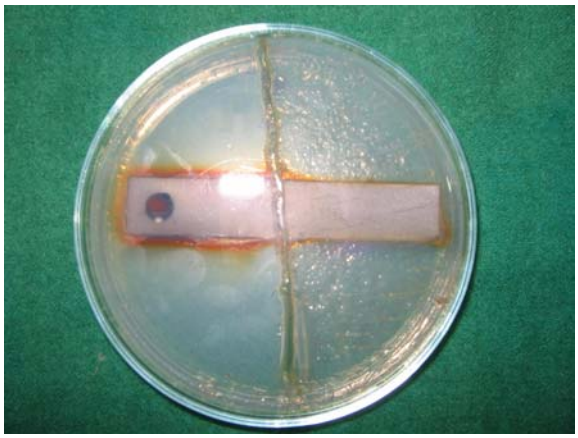


Figura 29: Ensaio controle da atividade hidrogenásica realizado com bactéria hidrogenase negativa.

No entanto, a partir da análise da Figura 30 é possível observar que os biofilmes dos cupons protegidos catodicamente ou não apresentaram a enzima hidrogenase ativa.

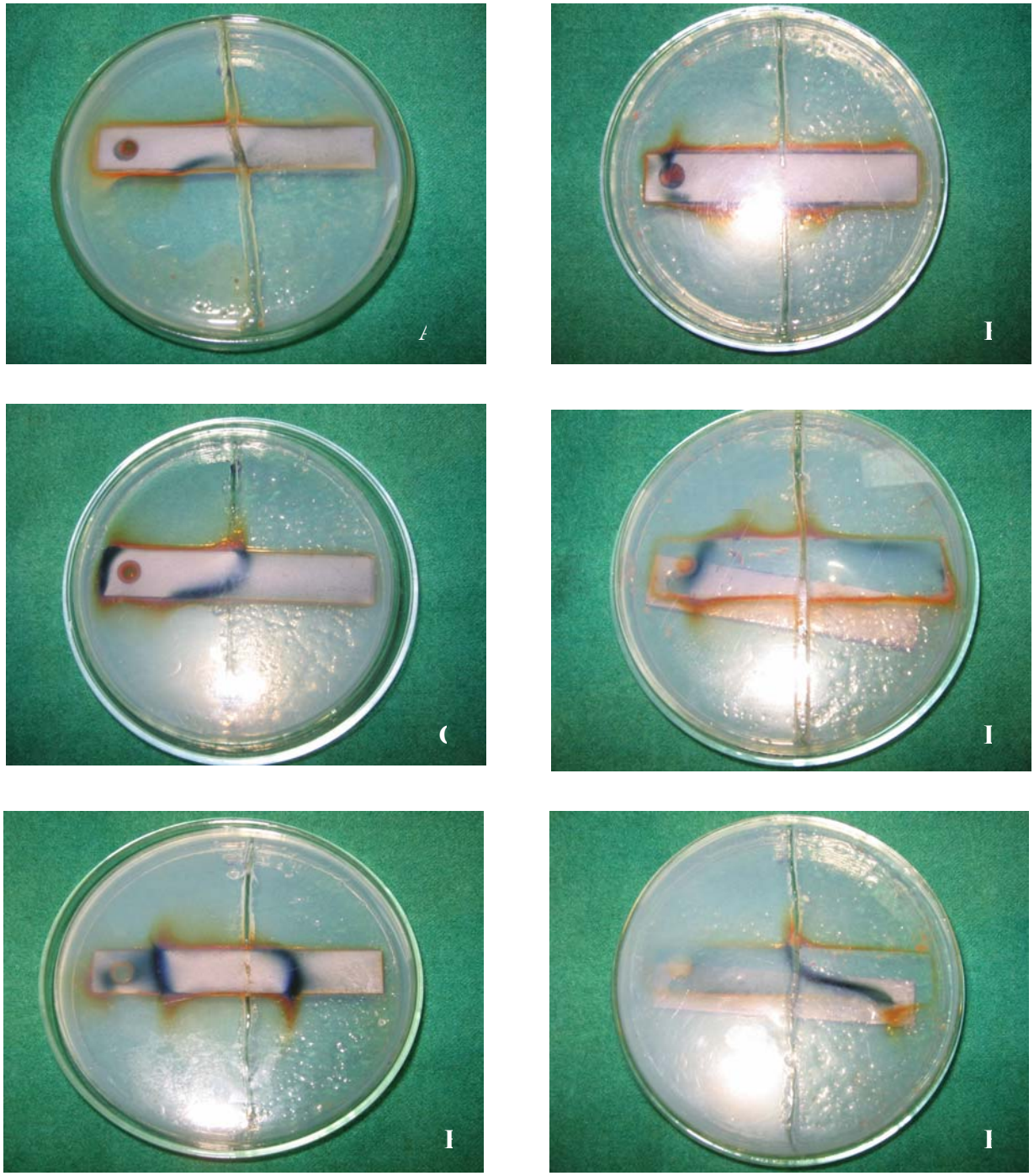


Figura 30: Atividade hidrogenásica dos biofilmes aderidos aos cupons: A) -800 mV com proteção e B) controle biótico I; C) -900 mV com proteção e D) controle biótico II; E) -1000 mV com proteção e F) controle biótico III.

Destaca-se que os biofilmes dos corpos-de-prova sob proteção catódica apresentaram uma coloração mais acentuada do que seus controles, cuja intensidade foi diretamente relacionada com a redução do potencial aplicado. Estes resultados sugerem ser a atividade hidrogenásica função da disponibilidade de H_2.

A ocorrência de liberação de hidrogênio, devido a um abaixamento excessivo do potencial, é justificada a partir da observação do diagrama E_h x pH (Figura 13). O domínio de imunidade do ferro se encontra abaixo da linha *a*, correspondente à redução de hidrogênio. Isto significa que, em condições de proteção catódica, a reação de redução de hidrogênio é termodinamicamente favorável, e sua cinética depende de fatores como pH da solução e da sobretensão de hidrogênio, ou seja, a diferença entre o potencial de polarização e o potencial de equilíbrio dado pela equação $2H^+ + 2e^- = H_2$ (BRASIL, 1996).

A liberação de hidrogênio foi visivelmente mais intensa durante a aplicação do potencial de -1000 mV, na ausência de microrganismos (Figura 31a). A visualização das bolhas de H_2 não foi tão expressiva nos ensaios com microrganismos provavelmente devido ao consumo pelas bactérias hidrogenásicas positivas (Figura 31b).

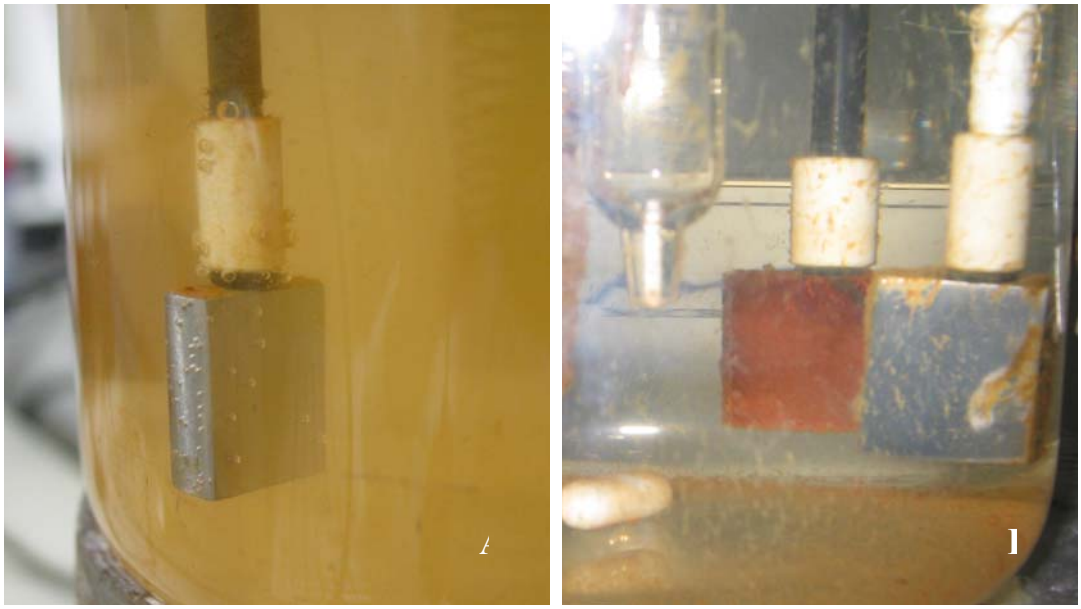


Figura 31: Evolução de hidrogênio no corpo-de-prova polarizado a -1000 mV (A - na ausência de microrganismos; B - na presença).

De acordo com da Silva, Basséguy e Berguel (2004) a capacidade de adaptação das bactérias a diferentes ambientes, possibilita que mesmo estirpes consideradas hidrogenase-negativas possam se tornar positivas durante processos corrosivos. A disponibilidade de hidrogênio pode ter induzido o seu metabolismo pelas bactérias presentes no biofilme.

O aparecimento de áreas marrom-amarelada observadas parece ser devido à presença de compostos insolúveis de ferro como Fe_20_3 ou $Fe(OH)_3$ formados como resultado da oxidação do metal por pequenas quantidades de oxigênio presente no nitrogênio, no ágar ou na superfície do próprio metal.

Na Figura 32 tem-se a observação microscópica da suspensão do biofilme em tampão fosfato corada pelo método de Gram. Os biofilmes obtidos a partir dos três potenciais estudados apresentaram células de similar morfologia microscópica; em sua grande maioria na forma de bastonetes Gram-negativos. Note-se que tanto as BRS quanto as bactérias principais responsáveis pela formação de EPS são Gram-negativas. Pode-se também observar a presença de alguns bastonetes ligeiramente curvos, conforme indicado pelas setas, morfologia característica de algumas espécies de BRS.

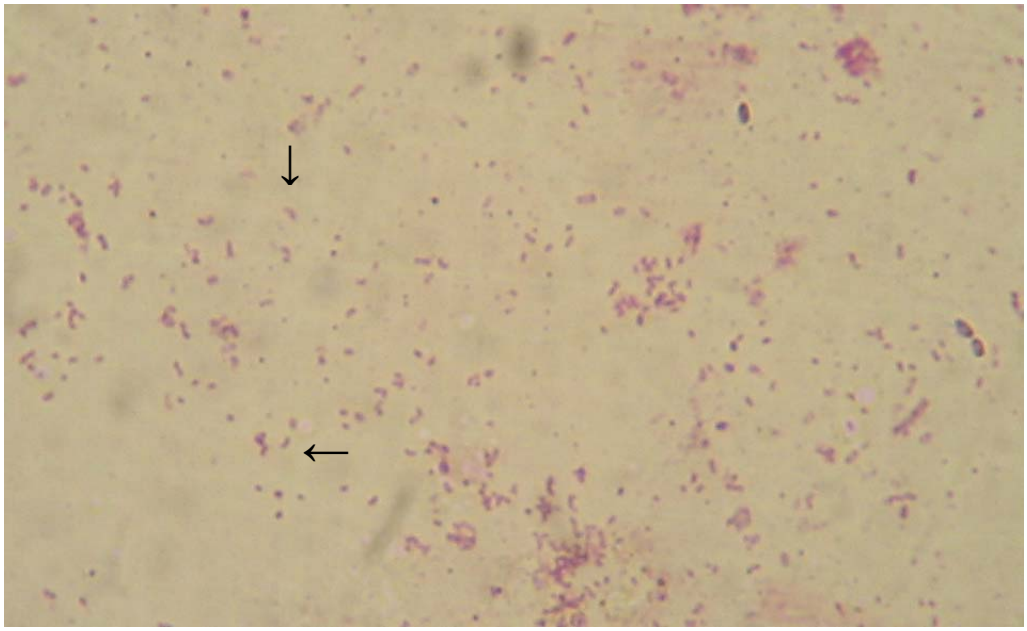


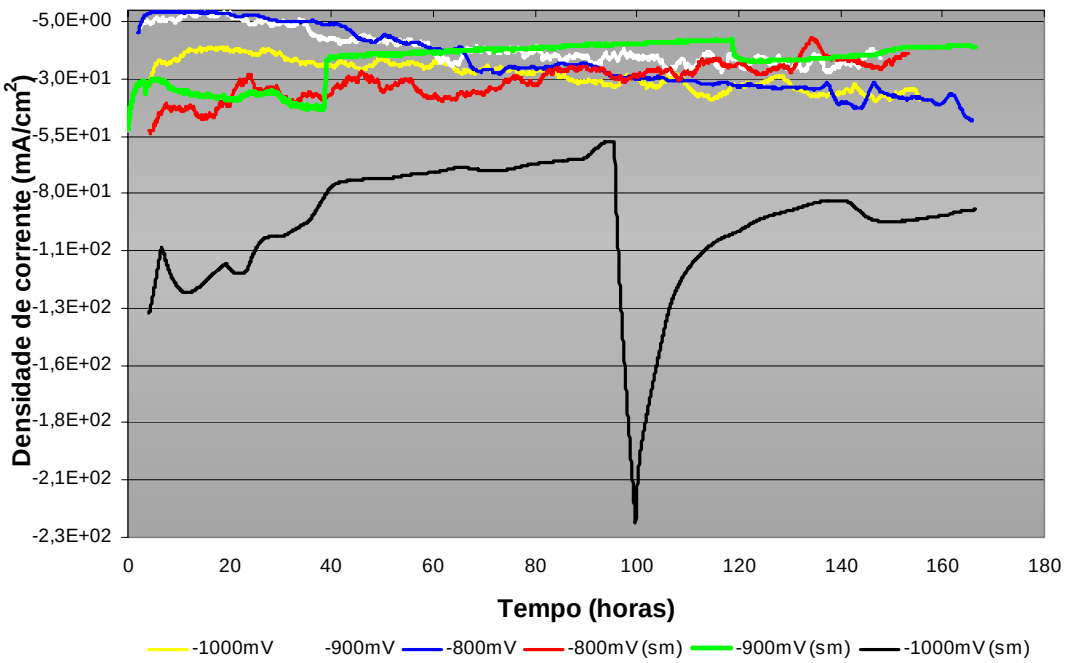
Figura 32: Observação microscópica de suspensão do biofilme.

Na tabela 4 estão apresentados os dados da quantificação de EPS produzido pelos biofilmes nos três potenciais estudados. A concentração de exopolissacarídeos presentes nos biofilmes formados sob proteção catódica foi menor comparativamente aos não protegidos. Esses resultados confirmam a reduzida carga microbiana presente nos cupons polarizados.

Tabela 4: Concentração do biopolímero nos biofilmes

Potenciais (mV)	**Concentração do Biopolímero (mg/L)**	
	Com proteção catódica	Sem proteção catódica
-800	1,35	5,56
-900	2,05	5,18
-1000	2,23	5,07

A Figura 33 apresenta a densidade de corrente de proteção catódica ao longo do tempo para os três potenciais estudados. Vale ressaltar que a densidade de corrente está mostrada em corrente catódica, ou seja, quanto mais negativa maior a corrente.



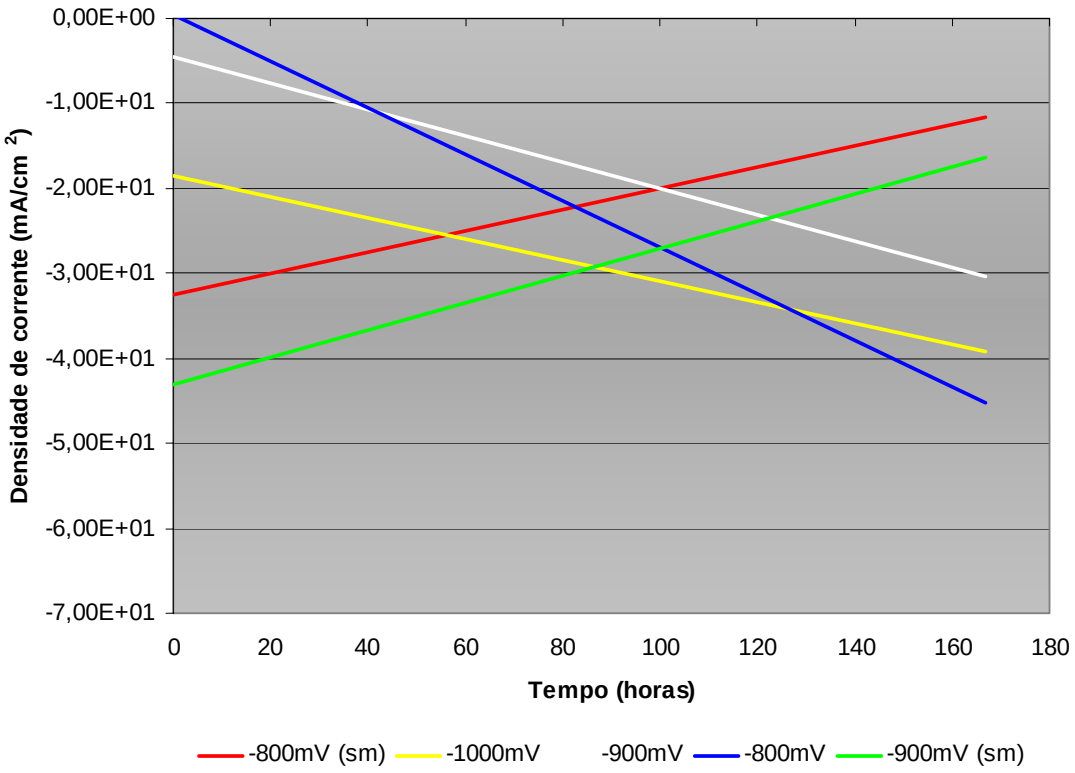
sm – ensaio realizado sem microrganismos

Figura 33: Densidade de corrente de proteção catódica ao longo do tempo.

A curva de densidade de corrente catódica obtida no ensaio realizado com água do mar estéril com cupons polarizados a 1000 mV (curva preta), apresentou um perfil bem distinto das demais curvas. É possível notar que a densidade de corrente sofre uma redução até aproximadamente 100 horas de ensaio. Essa redução pode ser devida à formação da barreira calco-magnesiana que detém o processo corrosivo reduzindo a corrente necessária para a proteção catódica. Contudo, ocorre um aumento súbito da densidade de corrente no tempo de cerca de 100 horas. Tal fato pode ser decorrente do desprendimento da camada de proteção pela intensa liberação de bolhas de hidrogênio nesse potencial, conforme pode ser visualizado na Figura 34. Após 100 horas, a densidade de corrente volta a diminuir indicando a formação novamente de um filme protetor sobre a superfície do cupom.

Figura 34: Desprendimento da camada formada sobre cupom polarizado a -1000mV em água do mar estéril.

Para a análise das demais curvas de densidade de corrente, foi construído um outro gráfico plotando-se as linhas de tendência das curvas com exceção da curva de -1000 mV (Figura 35).



sm- ensaio realizado sem microrganismos

Figura 35: Linhas de tendência linear obtidas nos ensaio de proteção catódica ao longo do tempo

É possível observar que nos ensaios realizados com água do mar sem microrganismos, a densidade de corrente diminui ao longo do tempo ao contrário do observado nos ensaios com microrganismos.

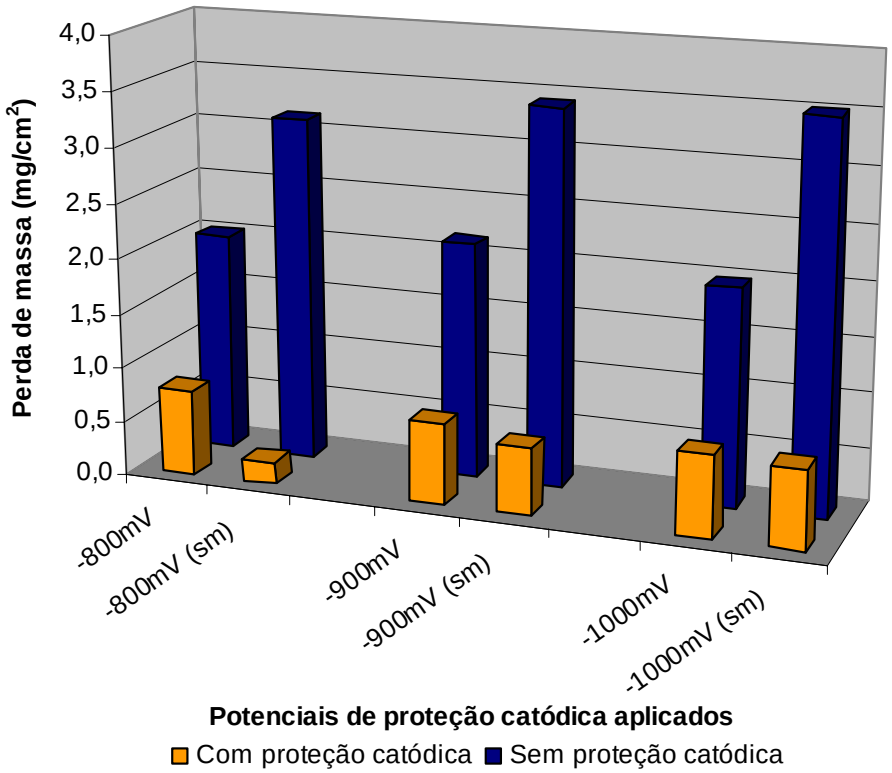
Na ausência de microrganismos, a proteção catódica aumenta o pH na interface metal/solução, uma vez que ocorre a redução dos íons hidrogênio e redução do oxigênio, causando a liberação de íons hidroxila. Essas reações levam a um aumento da alcalinidade que, tem um efeito benéfico na proteção de estruturas em água do mar. O bicarbonato presente no meio, em condição alcalina gerada pela reação catódica, tende a formar carbonatos. Por sua vez, a precipitação de carbonatos de cálcio e magnésio é reconhecidamente importante por agir como uma barreira física contra o ataque generalizado da corrosão,

podendo reduzir o teor de oxigênio dissolvido em contato com as superfícies metálicas e, consequentemente, reduzir a densidade de corrente necessária para manter um dado potencial, o que reduz os custos da proteção catódica (VIDELA, 2002).

O pH da interface metal/solução desempenha um papel importante na formação do depósito calcário e do biofilme. Esse pH interfacial depende da composição química da água, das espécies bacterianas e da densidade de corrente aplicada (NUNES, 2007).

Os ácidos orgânicos produzidos pela atividade das bactérias produtoras de ácido podem modificar o pH interfacial, além de mudar a cinética, os constituintes e a estabilidade estrutural do depósito formado sobre a superfície metálica. De acordo com Little, Wagner e Duquette (1988), o ácido acético produzido por algumas bactérias desestabiliza o depósito calcáreo formado sobre superfícies protegidas catodicamente. Assim, a atividade biológica na superfície metálica interfere nas reações eletroquímicas que ocorrem durante a proteção catódica e induzem mudanças na demanda de corrente catódica necessária para manter um potencial fixo sobre a superfície do aço carbono.

Na Figura 36 encontram-se os valores médios de perda de massa dos cupons com e sem proteção catódica. A perda de massa dos cupons que estavam sob proteção catódica foi similar nos ensaios realizados com microrganismos. No entanto, esses valores foram bem inferiores àqueles obtidos para os corpos-de-prova que não estavam protegidos.



sm – ensaios realizados sem microrganismos

Figura 36: Perda de massa dos cupons metálicos nos ensaios de proteção catódica

As perdas de massa dos cupons não protegidos nos ensaios sem microrganismos (sm) foram as maiores obtidas em todos os ensaios. Isso se deve ao fato do biofilme agir de certa forma como uma barreira para a difusão do oxigênio e do íon cloreto presente na água do mar dificultando o seu contato com a superfície metálica (POTEKHINA, 1999).

De acordo com a classificação da taxa de corrosão do aço carbono dada pela Norma NACE RP-07-75 (Tabela 5), os cupons que estavam sem proteção catódica apresentaram corrosão alta em todos os ensaios realizados. Já os cupons que estavam sob proteção catódica sofreram um processo de corrosão classificado como moderado. Não foi observado para os cupons protegidos catodicamente na presença de microrganismos variação significativa da taxa de corrosão generalizada entre os três potenciais aplicados. Contudo, a taxa de corrosão obtida para o cupom polarizado a -800 mV na presença de microrganismos foi

4 vezes superior à obtida para o mesmo potencial na ausência de bactérias. Esse aumento da taxa de corrosão em função da presença de microrganismos não foi tão evidente para os potenciais mais catódicos.

Tabela 5: Taxas de corrosão e classificação do processo corrosivo correspondente para os diferentes ensaios de proteção catódica

Ensaio		Taxa de corrosão (mm/ano)	Corrosão	Ensaio		Taxa de corrosão (mm/ano)	Corrosão
1	-800 mV	0,052	moderada	4	-800 mV	0,013	baixa
	Sem proteção	0,134	alta		Sem proteção	0,197	alta
2	-900 mV	0,050	moderada	5	-900 mV	0,041	moderada
	Sem proteção	0,144	alta		Sem proteção	0,229	alta
3	-1000 mV	0,050	moderada	6	-1000 mV	0,048	moderada
	Sem proteção	0,132	alta		Sem proteção	0,235	alta

Ensaios 1, 2 e 3: Realizados na presença de microrganismos
Ensaios 4, 5 e 6: Realizados na ausência de microrganismos

No caso de corrosão por ação de BRS, que leva a formação de pites, a extensão do processo corrosivo não pode ser determinada somente pela perda de massa. Quando se trata de corrosão localizada, a perda de massa é pequena, o que leva a crer ser um processo brando de corrosão. Porém, os danos da corrosão localizada podem ser muito severos uma vez que este tipo de corrosão é de difícil detecção e pode levar à ruptura do metal de forma inesperada. Além disso, a perda de massa não dá nenhuma informação sobre a profundidade de penetração dos pites tornando-se extremamente importante a análise da superfície metálica para determinação do número de pites, seu diâmetro e profundidade.

Na Figura 37 é possível observar que os cupons que estavam sob proteção catódica continuavam a apresentar aspecto espelhado, após a raspagem e decapagem diferentemente dos cupons não protegidos.

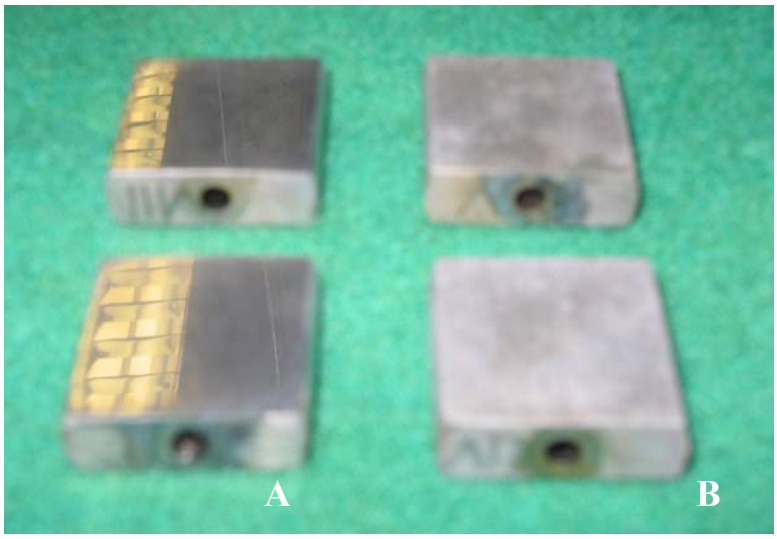


Figura 37: Aspecto dos cupons após a decapagem (A- cupons protegidos; B- cupons sem proteção catódica.

Logo, analisando apenas o aspecto dos cupons usados nos ensaios de proteção catódica não era possível visualizar nenhum ponto de corrosão localizada.

Porém, ao observar a superfície destes cupons em estereoscópio foi possível detectar a presença de regiões de ataque. Há uma nítida distinção entre os cupons protegidos e os não protegidos. Nestes últimos, houve um ataque generalizado da superfície independentemente da presença ou não de microrganismos (Figura 38).

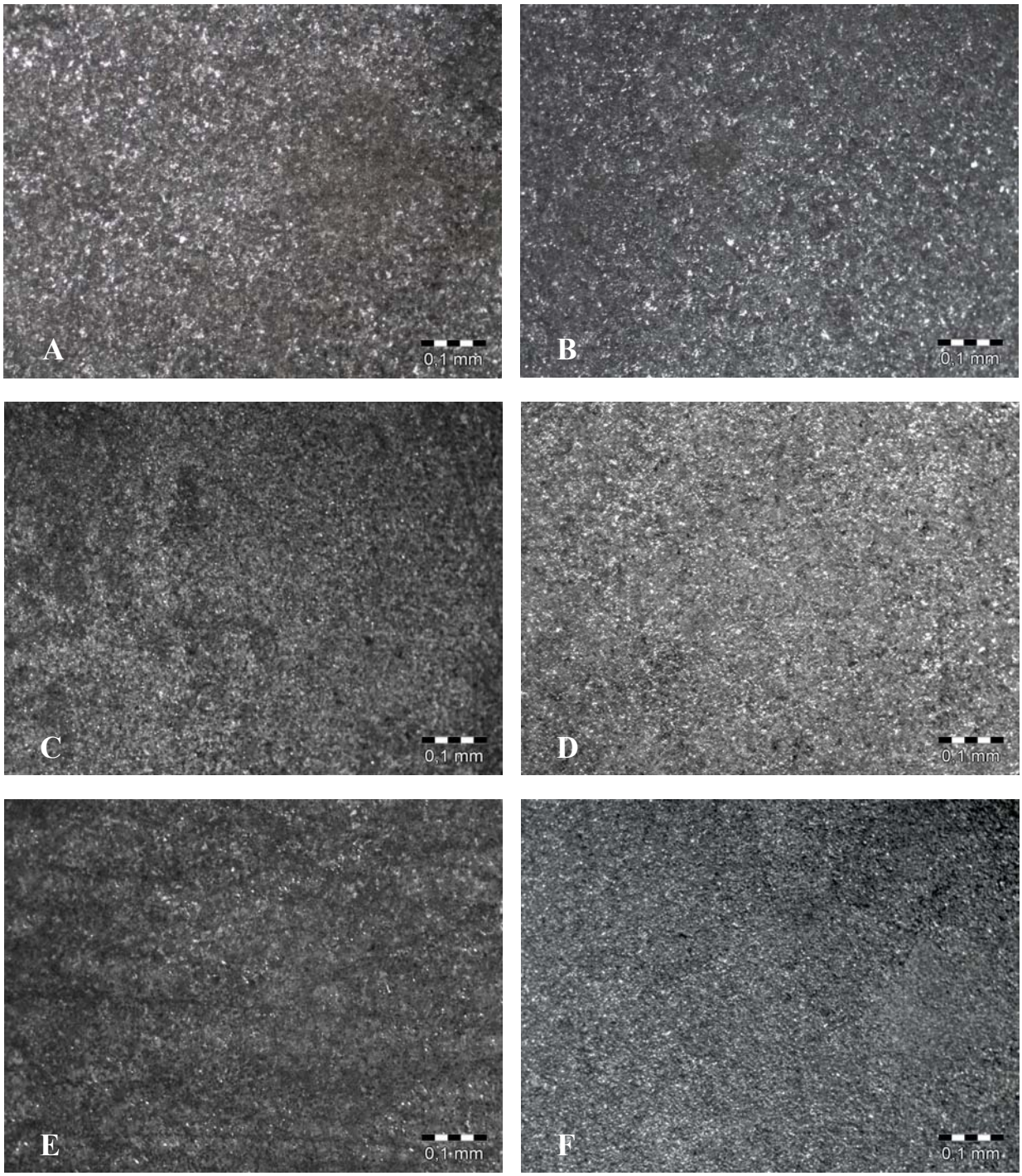


Figura 38: Superfície dos corpos-de-prova sem proteção catódica dos diferentes ensaios realizados: A) controle biótico I; B) controle abiótico II; C) controle biótico II; D) controle abiótico II; E) controle biótico III e F) controle abiótico III (aumento de 20X).

Pode-se observar para os cupons polarizados uma diferenciação de ataque, tanto maior quanto mais catódico o potencial aplicado (Figuras 39 a 41). Note-se que nas figuras constam todos os pontos de ataque localizado para cada potencial estudado.

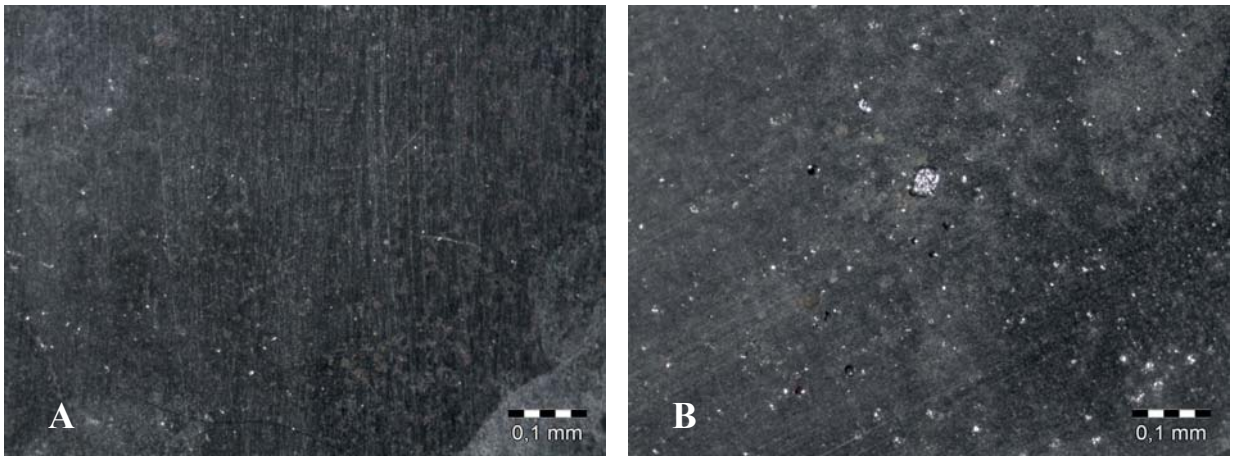


Figura 39: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -800 mV (A- na ausência de microrganismos e B- na presença de microrganismos -20X).

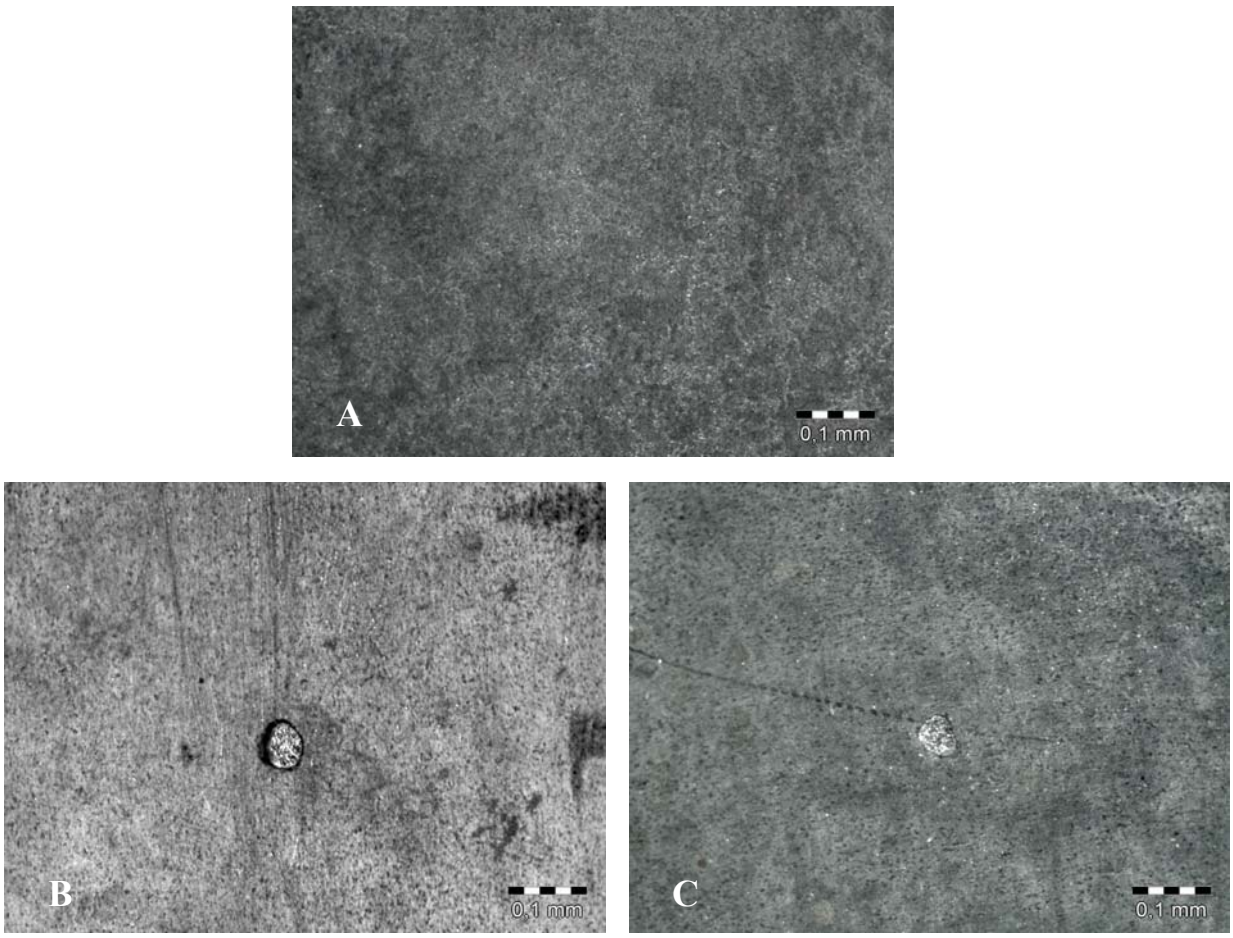


Figura 40: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -900 mV (A- na ausência de microrganismos; B e C- na presença de microrganismos).

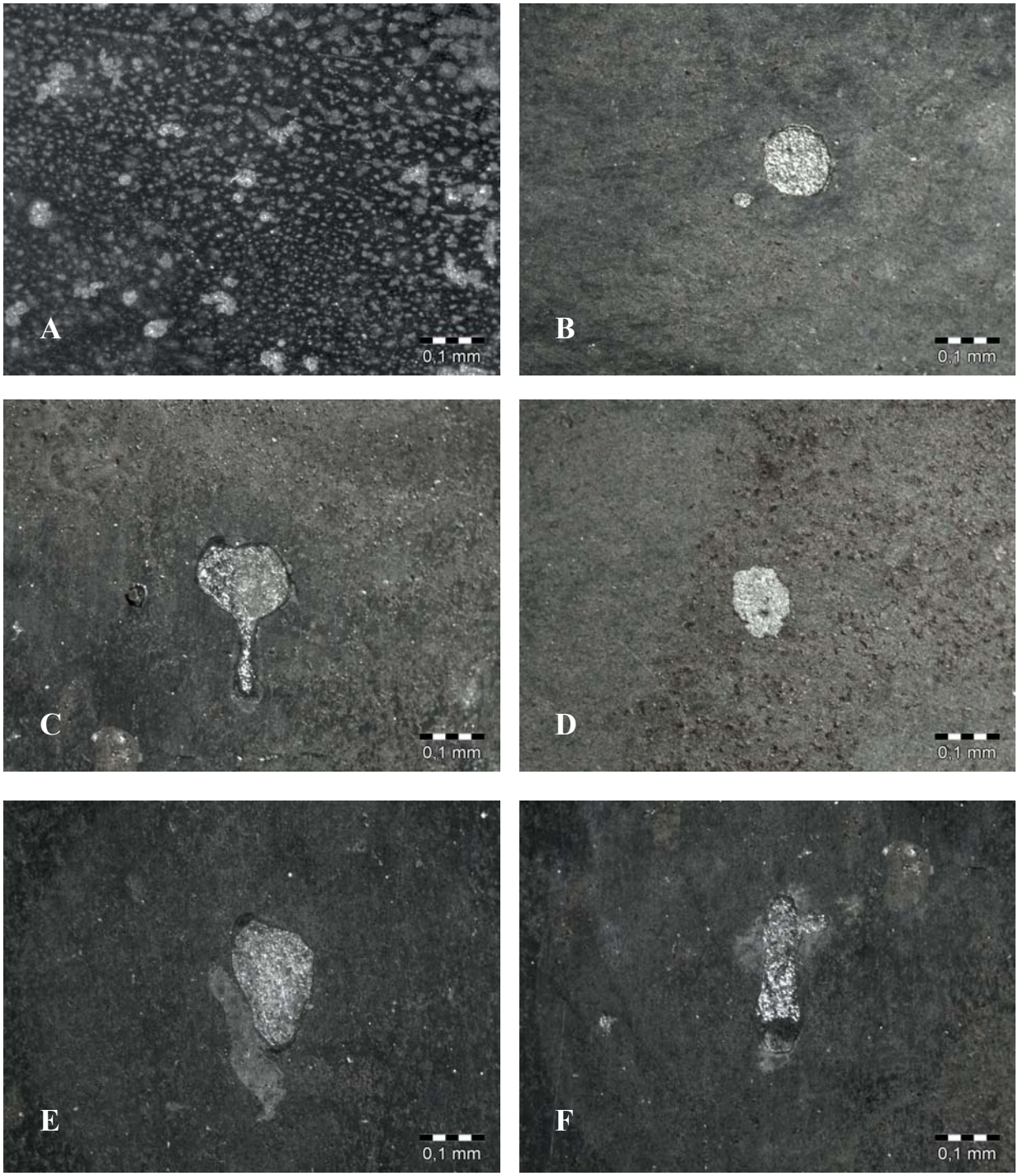


Figura 41: Superfície dos corpos-de-prova polarizados a -1000 mV (A- na ausência de microrganismos; B a F- na presença de microrganismos)(aumento de 20X).

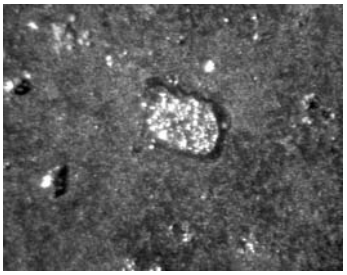
Com base na observação das superfícies dos corpos-de-prova foram determinadas as densidades de pites para cada potencial aplicado, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Dados da corrosão localizada dos corpos-de-prova protegidos catodicamente na presença de microrganismos

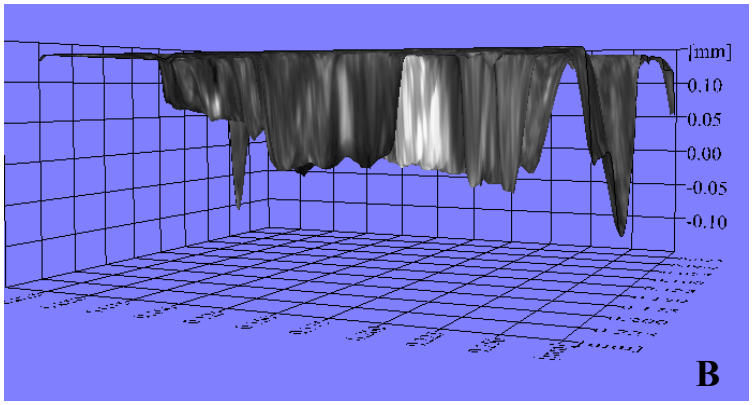
Potenciais (mV)	Nº de áreas de corrosão localizada	Diâmetro da área (mm)	Densidade de pites (pites/m^2)	Profundidade média dos pites (mm)
-800	1	0,12	6 x 10^3	0,20
-900	2	0,22	1 x 10^4	0,36
-1000	5	0,42	1 x 10^5	0,50

Conforme pode-se observar, o número de áreas de corrosão localizada aumentou com o aumento do potencial catódico empregado. O diâmetro da área, a densidade de pites, assim como a profundidade média dos pites também foi proporcional ao aumento do potencial catódico.

A Figura 42 mostra a imagem em 3 dimensões do ataque localizado observado no cupom protegido catodicamente a -800 mV na presença de microrganismos. Nesta condição foram encontrados os pites menos profundos.



A



B

Figura 42: Imagens do ataque localizado sobre o cupom protegido a -800 mV na presença de microrganismos (A- ataque localizado; B- imagem tridimensional do ataque localizado).

Do mesmo modo, na Figura 43 são apresentadas as imagens do maior pite encontrado (cupons protegidos a -1000 mV na presença de microrganismos).

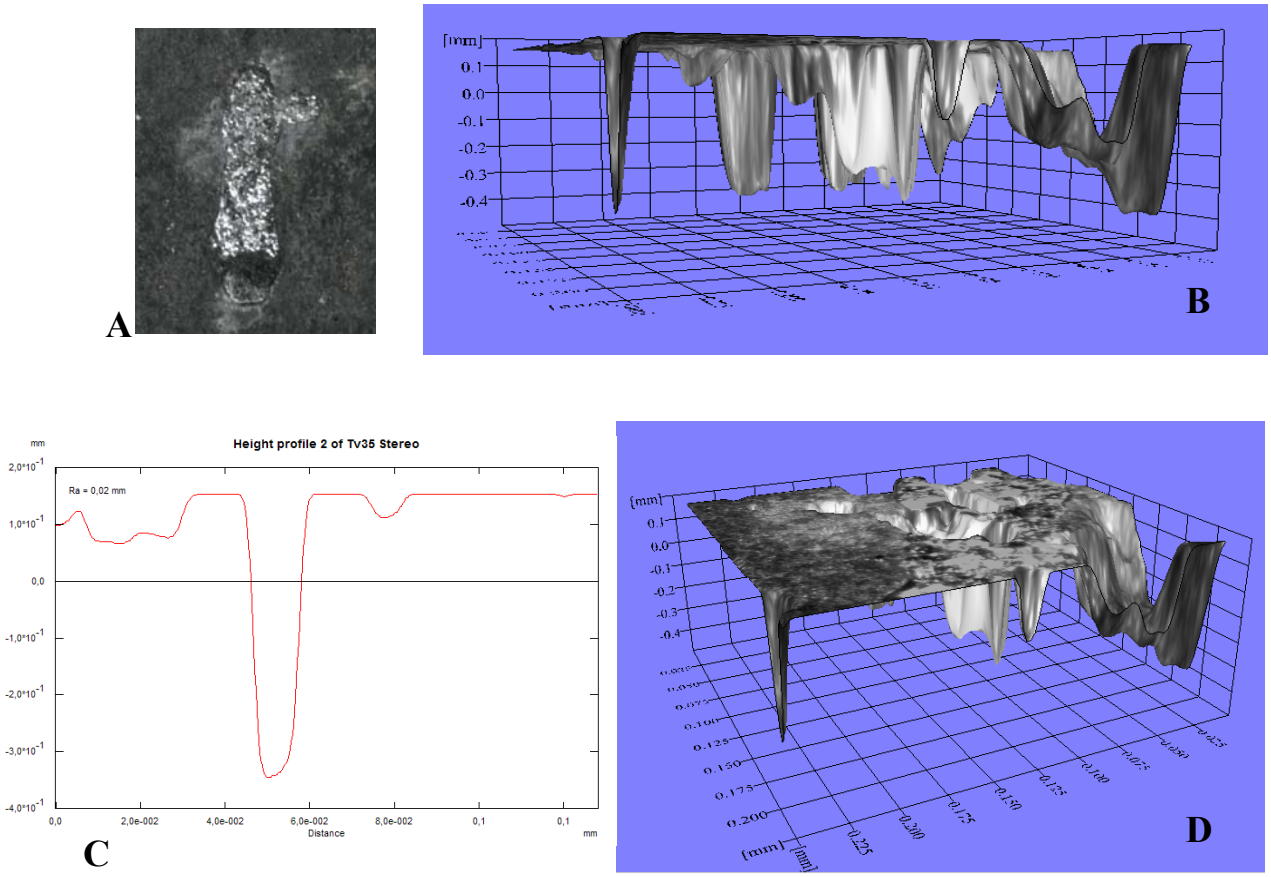


Figura 43: Imagens de uma das áreas de ataque localizado sobre o cupom protegido a -1000 mV na presença de microrganismos (A- ataque localizado; B e D- imagem tridimensional do ataque localizado; C- imagem representativa do corte transversal do pite).

A heterogeneidade da superfície abaixo do biofilme e o resultante aumento da variabilidade da composição química do ambiente ponto a ponto ao longo da superfície do material propiciaram a corrosão localizada. Esse fato também já foi relatado por outros autores (VIDELA, 1994 e ROMERO *et al.*, 2004).

O aumento das regiões de corrosão localizada em relação ao potencial aplicado pode ser devido ao aumento da produção de

hidrogênio catódico. Dexter e Lin [1991] observaram a evolução de hidrogênio em superfícies catódicas em densidades de corrente acima de 100 $\mu A/cm^2$. Neste trabalho, densidade de corrente acima de 200 mA/cm^2 foram obtidas. Assim, as BRS hidrogenase-positivas retiraram o hidrogênio que estava polarizando a superfície metálica tornando-a suscetível à corrosão novamente, além de formar sulfeto que também contribui para o agravamento do processo corrosivo.

Contudo, não parece existir uma relação direta do número de BRS detectadas em um ponto de corrosão com a severidade desta, uma vez que é possível que um pequeno número de BRS com hidrogenase muito ativa seja mais corrosivo que um grande número de BRS com hidrogenase menos ativa.

CAPÍTULO V

Conclusões e Recomendações

V.1 – CONCLUSÕES

- A associação das culturas microbianas (BRS/ *Pseudomonas aeruginosa*) particularmente, em aerobiose, foi a mais adequada para o desenvolvimento das BRS, apesar destas bactérias serem anaeróbias estritas. A disponibilidade de oxigênio provavelmente propiciou a produção mais intensa de EPS pela bactéria *Pseudomonas,* criando condições nutricional e física favoráveis à atividade das BRS;

- Os ensaios realizados com a associação de *Pseudomonas* e BRS, quer em aerobiose quer em anaerobiose, apresentaram perdas de massa superiores a determinada para apenas BRS em anaerobiose, sendo o aumento da perda de massa diretamente proporcional ao tempo de exposição. A maior perda de massa foi determinada em condição de aerobiose;

- Pode-se estabelecer que os microrganismos efetivamente intensificam o processo corrosivo, sendo que a presença de diferentes espécies microbianas no biofilme, por conta dos produtos gerados e da sua interrelação nesta estrutura, compromete severamente a vida útil do aço carbono quando exposto à água do mar;

- As curvas anódicas mostraram que o aço carbono apresentou dissolução ativa em todos os ensaios realizados, ou seja, nenhum domínio de passivação ocorreu na faixa de polarização realizada;

- Para proteção catódica de cupons expostos a BRS/*Pseudomonas*, após 28 dias, haveria necessidade de uma maior densidade de corrente a ser aplicada de 1,03 mA/cm^2 para potencial de –900 mV. Já para a proteção catódica do aço carbono exposto a apenas BRS em anaerobiose, de acordo com as curvas levantadas, a densidade de corrente seria muito inferior, de 0,24 mA/cm^2 para o mesmo potencial;

- O número de bactérias aderidas aos cupons que estavam sob proteção catódica foi inferior ao obtido para os cupons que não estavam sob proteção, para as polarizações testadas;

- Ao contrário do que é indicado ma literatura, a redução do potencial de proteção catódica parece favorecer o crescimento das BRS;

- Os biofilmes dos cupons, catodicamente protegidos ou não, apresentaram a enzima hidrogenase ativa; a atividade hidrogenásica foi mais intensa nos biofilmes formados sobre os corpos-de-prova sob proteção catódica. Estes resultados sugerem ser a atividade hidrogenásica função da disponibilidade de H_2;

- Nos ensaios realizados com água do mar sem microrganismos, a densidade de corrente diminui ao longo do tempo ao contrário do observado nos ensaios com microrganismos;

- Os cupons que estavam sem proteção catódica apresentaram corrosão alta. A taxa de corrosão obtida para o cupom polarizado a -800 mV na presença de microrganismos foi 4 vezes superior à obtida para o mesmo potencial na ausência de bactérias. Esse aumento da taxa de corrosão em função da presença de microrganismos não foi tão evidente para os potenciais mais catódicos.

- Ao observar a superfície dos cupons protegidos catodicamente em estereoscópio foi possível detectar a presença de regiões de ataque. O número de áreas de corrosão localizada aumentou com o aumento do potencial catódico empregado. O diâmetro da área de corrosão, a densidade de pites, assim como a profundidade média dos pites também foi proporcional ao aumento do potencial catódico;

- Não parece existir uma relação direta do número de BRS detectadas em um ponto de corrosão com a severidade desta, uma vez que é possível que um pequeno número de BRS com hidrogenase muito ativa seja mais corrosivo que um grande número de BRS com hidrogenase menos ativa.

V.2 – RECOMENDAÇÕES

- Estudar a variação da comunidade microbiana nos diferentes potenciais aplicados através de técnicas moleculares como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE);
- Estudar a aplicação de revestimentos aliados à proteção catódica para controle da CMI;
- Determinar a influência do potencial de proteção catódica na corrosão microbiológica do aço carbono AISI 1020 em solo contendo diferentes concentrações de BRS e teores de umidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELL, P. Understanding microbially influenced corrosion as biofilm-mediated changes in surface chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.269-272, 1999.

BARTON, L.L. Sulphate-reducing bacteria. Biotechnology Handbooks. Series Editors: Tony Atkinson and Roger f. Sherwood. Plenum Press, New York and London. V.8, p.333, 1995.

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

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

BEECH, I.B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current opinion in Biotechnology**, v.15, p.181-186, 2004.

BLINC, D. Biofilms, 2008. Disponível em http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/biofilms.htm. Acesso em: 29 jan. 2008.

BOGAN, B.W.; LAMB, B.M.; HUSMILLO, G.; LOWE, K.; PATEREK, R.J; KILBANE II, J.J. Development of an Environmentally Benign Microbial Inhibitor to Control Internal Pipeline Corrosion. **Gas Technology Institute**, Final Report, 2004.

BORENSTEIN, S.B. Microbiologically Influenced Corrosion Handbook, Industrial Press Inc., New York, 1994.

BRANDIS, A.; THAUER, R.K. Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulphate as sole energy source. **Journal of General Microbiology**, v.126, p.249-252, 1981.

BRASIL, S.L.D.C. Efeito de falha no revestimento externo de dutos sob proteção catódica. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

BROEDELIUS, P.; VANDAMME, E.J. Immobilised cell systems. In: biotechnology, v. 7a: Enzyme Technology, eds H.J. Rehm & G. Reed VCH Publishers, Germany, p. 413, 1987.

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Review**, v.46, p.165-173, 1987.

CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA JR, G.L. Metabolic Blocking of Exopolysaccharides Synthesis: Effects on Microbial Adhesion and Biofilm Accumulation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 1-4, 1998.

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

CHAN, K.Y., XU, L.C., FANG, H.H.P. Anaerobic electrochemical corrosion of mild steel in the presence of extracellular polymeric substances produced by a culture enriched in sulfate-reducing bacteria. **Environmental Science technology**, v. 36, n.8, p.1720-1727, 2002.

CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. Biofilms. John Wiley & Sons, INC, New York, 1990. 796 p.

COETSER, S.E; CLOETE, T.E. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. **Critical Reviews in Microbiology**, v.31, p.213-232, 2005.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p.711-745, 1995.

DA SILVA, S.; BASSÉGUY, R.; BERGUEL, A. The role of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrossion of steels. Bioeletrochemistry, v.56, p.77-79, 2004.

DAVEY, M.E.; O'TOLLE, G.A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DAVIS, J.B. Petroleum microbiology. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York, 1967. 55 p.

DE MELE, M.F.L. Influence of cathodic protection on the initial stages of bacterial fouling. Biocorrosion Biofouling Proc. – NSF-CONICET Wokshop (60XMAP); p. 181-90, 1993.

DEXTER, S.C.; LIN, S.H. Effect of marine bacteria on calcareous deposition. Mp – **Materials Performance**; USA; DA.; v.30; n.4; p. 16-21. 1991.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem**., v.28, n.3, p. 350 – 356, 1956.

EDYVEAN, R.G.J. Interactions between microfouling and the calcareous deposit formed on cathodically protected steel in seawater. **Proc. 6th Intl. Cong. On Marine Corrosion and Fouling**, v.1. Marine Biology, Athens, pp. 469-72. 1984.

EDYVEAN, R.G.J., MAINES, A.D., HUTCHINSON, C.J., SILK, N.J., EVANS, L.V. Interactions between cathodic protection and bacterial settlement on steel in seawater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.29, p.251-271, 1992.

EDWARDS, K.J.; HU, B.; HAWERS, R.J.; BANFIELD, J.F. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. **FEMS Microbiology Ecology**, n.34, p.197-206, 2001.

FASSARELA, M.; SERVULO, E.F.C.; CAMMAROTA, M.C. Ação do Glutaraldeído em biofilmes marinhos. COTEQ, 2007.

FILIATRAULT, M.; PICARDO, K.K.; NGAI, H.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B.H. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. Infection and Immunity, v.74, n.7,p.4237-4245, 2006.

GENTIL, V. **Corrosão**. 3ªed.rev. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2003.

GONÇALVES, N.J. Potencialidade do tratamento por choque com biocidas na remoção e/ou formação de biofilmes. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

GONÇALVES, N.J.; FRANÇA, F.P.; SÉRVULO, E.F.C. Evaluation of commercial biocides efficacy on biofilm during shock treatment. In: **5º Congreso de Corrosión de la NACE región latinoamerica**, Santiago. LATINCORR 2003, p. 894-899, 2003.

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

GUEZENNEC, J.G.; DOWLING, N.J.E.; CONTE, M.; ANTOINE, E.; FIKSDAL, L. Cathodic protection in marine sediments and the aerated water column. In: **Microbially Influenced Corrosion and Biodeterioration**, p. 6-43, 1991.

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

HAMILTON, W.A. Role of Sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review. **Biofouling**, v.8, p.165-194, 1995.

HARRISON JR., A.P. Microbial sucession and mineral leaching in a artificial coal spoil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.131, p.68-76, 1982.

HERNANDEZ, G., KUCERA, V., THIERRY, D., PEDERSEN, A., HERMANSSON, M. Corrosion inhibition of steel by bacteria. **Corrosion Science**. n.8, 1994.

IEC Instalações e Engenharia de Corrosão – Sistemas de Proteção Catódica, Ed. Diagraphic, 1990.

IGNATIADIS, I., AMALHAY, M. Experimental study of corrosion of two stainless steels during the oxidative bacterial dissolution of pyrite using mass loss and electrochemical techniques. **International Journal of mineral processing**, v.62, p.199-215, 2001.

IVERSON, W.P. Direct evidence for the cathodic depolarization theory of bacteria. **Corrosion Science**, v.151, p.986-988, 1966.

IVERSON, W.P. Microbial corrosion of metals. **Advances in Applied Microbiology**, v.32, p. 1–36, 1987.

JANNING, K.F.; BAK, S.N.; ANDERSEN, M.; KRISTENSEN, G.H. High biofilm activity under increased oxygen concentrations in a pressurized system. **Water Science & Technology**, v.52, n.7, p.69-75, 2005.

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

JUZELIUNAS, E.; RAMANAUSKAS, R.; LUGAUSKAS, A.; LEINARTAS, K.; SAMULEVICIEM, M.; SUDAVICIUS, A.; JUSKENAS, R. Microbially influenced corrosion of zinc and aluminum – two years of *Aspergillus niger*. **Corrosion Science**, v. 49, n. 11, p.4098-4112, 2007.

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

KLINTWORTH, R.; REHER, H.I. Biological induced corrosion of materials II. New test methods and experiences from MIR station. **Acta Astronautica**, v. 44, n.7-12, p. 569-578, 1999.

KNIEMEYER, O.; MUSAT, F.; SIEVERT, S.M.; KNITTEL, K.; WILKES, H.; BLUMENBERG, M.; MICHAELIS, W.; CLASSEN, A.; BOLM, C.; JOYE, S.B.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature**, v.449, p.898-901, 2007.

KOCH, G.H.; BRONGERS, M.P.H.; THOMPSON, N.G.; VIRMANI, Y.P.; PAYER, J.H. Corrosion costs and preventive strategies in the US. Report by CC Technologies Laboratories Inc. to Federal Highway Administration (FHWA), Office of Infrastructure Research and Development Report FHWA-RD-01-156, 2001.

LEWANDOWSKI, Z., STOODLEY, P., ROE, F. Internal mass transport in heterogeneous biofilms: recent advances. **Corrosion**. Paper nº 222, NACE International, Houston, TX, 1995.

LEWANDOWSKI, Z. MIC and biofilm heterogeneity. **Corrosion**. Paper nº 0400, 2000.

LICINA, G.J. Microbiologically-influenced corrosion in nuclear power plants – a review of susceptibility and mitigation methods. **Corrosion**. Paper nº 527, NACE International, Houston, TX, 1990.

LITTLE, B.; WAGNER, P.; DUQUETTE, D. Microbiologically induced increase in corrosion current density of stainless steel under cathodic protection. Naval Ocean Research and Development Activity Stennis Space center MS.1988.

LITTLE, B.; STAEHLE, R.; DAVIS, R. Fungal influenced corrosion of post-tensioned cables. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.71-77, 2001.

MA, H. The influence of hydrogen sulfide on corrosion of iron under different conditions. **Corrosion Science**, v.42, n.10, p.1669-1683, 2000.

MARCUS, P.; OUDAR, J.; Corrosion mechanisms in theory and practice. Series Corrosion Technology, v.8. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995, 641 p.

MATIAS, P.M.; PEREIRA, I.A.C.; SOARES, C.M.; CARRONDO, M.A. Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.89, p. 292-329, 2005.

MOISEEVA, L.S.; KONDROVA, O.V. Biocorrosion of oil and gas field equipment and chemical methods for its suppression I. **Protection of metals**, v. 41, n.4, p.385-393, 2005.

MORTON, L.H.G., SURMAN, S.B. Biofilms in biodeterioration – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.34, n.3-4, p.203-221, 1994.

Norma ASTM G1-03: Standard Practice for Preparing, cleaning and Evaluation Corrosion Test Specimens, ASTM – **American Society for Testing and Materials**, 2003.

Norma ASTM G 46/76: Examination and Evaluation of Pitting Corrosion, ASTM – **American Society for Testing and Materials**, 2005.

Norma BS 7361-1. Cathodic Protection- Part 1: Code of practice for land and marine applications. p. 11, 1991.

Norma DNV-RP-B401, Cathodic Protection Design. p. 10, 2005.

Norma ISO 15589-1, Petroleum and natural gas industries- Cathodic protection of pipeline transportation systems. p. 6, 2003.

Norma NACE RP-07-75. Standard recommended practice, preparation, installation, analysis and interpretation of corrosion coupons in oilfield operations. 1999.

NUNES, L.P. **Fundamentos de Resistência à Corrosão**. 1ªed. Interciência, Rio de Janeiro. 2007.

PEREZ, E.J.; CABRERA-SIERRA, R.; GONZALEZ, I.; RAMIREZ-VIVES, F. Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. Corrosion Science, v.49, p. 3580- 3597, 2007.

PINEAU, S.; DUPONT, I.; BRAISAZ, T. Interrelationship between cathodic protection and microbiologically influenced corrosion um marine environment: Brief-review and prospects. **13th International Harbour Congress Proceeedings**, Bélgica, p. 169-178, 2003.

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

POTEKHINA, J.S.; SHERISSHEVA, N.G.; POVETKINA, L.P.; POSPELOV, A.P.; RAKITINA, T.A.; WARNECKE, F.; GOTTSCHALK, G. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. Applied Microbiology Biotechnology, n.52, p.639-645, 1999.

RABUS, R.; HANSEN, T.; WIDDEL, F. Dissimilatory sulfate-and-sulfur-reducing prokaryotes. In: Dworkin MEA (Ed.), The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for Microbiological Community, Springer, NY, 2000.

RAJASEKAR, A.; MARUTHAMUTHU, S.; MUTHUKUMAN, W.; MOHANAN, S.; SUBRAMANIAR, P.; PALANISWAMY, N. Bacterial degradation of naphtha and its influence on corrosion. **Corrosion Science**, v.47, p.257-271, 2005.

RAMESH, S.; RAJESWARI, S. Evaluation of inhibitors and biocide on the corrosion control of copper in neutral aqueous environment. **Corrosion Science**, v.47, p.151-169, 2005.

RAO, T.S., KORA, A.J., ANUPKUMAR, B., NARASIMHAN, S.V., FESER, R. Pitting corrosion of titanium by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio vulgaris*). **Corrosion Science**, v.47, p.1071-1084, 2005.

ROMERO, M.F.; PARRA, J.; RUIZ, R.; OCANDO, L.; BRACHO, M.; RINCON, O.T.; ROMERO, G.; QUINTERO, A. Cathodic Polarization

effect on sessile SRB growth and iron protection. **Corrosion**. Paper 06526, p. 1-22, 2006.

SAND, W.; GEHRKE, T. Microbially influenced corrosion of steel in Aqueous Environments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.2, n.2-4, 2003.

SHANNON, J.S.; BOGGS, J.D.A. nature of sulphides and their corrosive effect on ferrous metals: a review. **Br. Corros, J**., v.10, n.3, p.136-142, 1975.

SILVA, A.J.N.; TANIS, J.N.; SILVA, J.O.; SILVA, R.A. Alcohol Industry Biofilms and their effect on corrosion of 304 stainless steel. In: Biologically Induced Corrosion. SC Dexter (ed.), NACE International, Houston, TX. p.76,1986.

STAROSVETSKY, D.; ARMON, R.; YAHALOM, J.; STAROSVETSKY, J. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.79-87, 2001.

STOTT, J.F.D.; DICKEN, G.; RIZK,T.Y. Corrosion Inhibition in PWRI Systems That use Nitrate Treatment to Control SRB Activity and Reservoir Souring. **Corrosion**, Paper 08507, p.1-20, 2008.

SODRÉ, C.J.S. Estudo do efeito microbiano sobre a corrosão do aço-carbono 1020 em meio marinho anaeróbio. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996. 79 p.

SOUZA, M.O.; SÉRVULO, E.F.C.; FRANÇA, F.P. Evaluation of THPS Biocide efficacy on biofilm control at different exposure times. 16th International Corrosion congress, 2005.

SYRETT, B. Corrosion can be prevented by bacteria. **Materials Performance**, v.42, n.7, p.34, 1995.

TORRES, E.S. Cinética de parâmetros microbiológicos na formação de biofilmes. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

TORRES, E.S.; de FRANÇA, F.P. Kinetics of biofilm formation as a function of dissolved oxygen concentration on AISI-1020 carbon steel coupons. **Corrosion Reviews**, v.20, n.1-2, p.115-128, 2002.

VIDELA, H.A.; SARAVIA, S.G.; DE MELE, M.F. Interactions between sulfate-reducing bacteria biofilms and stainless steels under cathodic protection. In: **First NACE Latin-American Region Corrosion Congress**, v.2, p. 1/94091-8/94091, 1994.

VIDELA, H.A.; Fundamentals of Electrochemistry. In: **Manual of Biocorrosion**. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1996. p.75.

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

VIDELA, H.A. Biocorrosão, Biofouling e Bioterioração de materiais. 1ª ed., Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2003.148 p.

VON WOLZOGEN KUHR CAH, VAN DER FLUGT LS; De grafiteering van gietijzer als electrobiochemisch proces in anaerobe gronden. Water (den Haad) v.18, p.147-165, 1934. [Tradução para o inglês publicada em 1961: **Corrosion,** v.17, p.293-299.

WARSCHEID, T.H.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.46, p.343-368, 2000.

ZINKEVICH, V., BOGDARINA, I., KANG, H., HILL, M.A.W., TAPPER, R., BEECH, I.B. Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.163-172, 1996.

ZUO, R.; KUS, E.; MANSFELD, F.; WOOD, T.K. The importance of live biofilms in corrosion protection. **Corrosion Science**, v.47, p.279-287, 2005.