



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - CCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
PETRÓLEO – PPGCEP

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE BIOFILMES
FORMADOS EM SISTEMA DINÂMICO**

Marcelino Gevilbergue Viana

Orientador: Prof. Dr. Djalma Ribeiro da Silva
Co-orientador (a): Dr^a. Márcia Teresa S. Lutterbach

Natal / RN, Agosto de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE BIOFILMES
FORMADOS EM SISTEMA DINÂMICO**

Marcelino Gevilbergue Viana

Natal / RN, Agosto de 2009.

Marcelino Gevilbergue Viana

Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo PPGCEP, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Petróleo.

Aprovado em ____ de _____ de 2009.

Prof. Dr. Djalma Ribeiro da Silva
Orientador - UFRN

Dr^a. Márcia Teresa S. Lutterbach
Co-orientador - INT

Prof^a. Dr^a. Tereza Neuma de C. Dantas
Membro Interno - UFRN

Prof^a. Dr^a. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque
Membro Externo - UERN

VIANA, Marcelino Gevilbergue - Avaliação de produtos naturais no controle de biofilmes formados em sistema dinâmico. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo. Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento em Ciência e Engenharia de Petróleo. Linha de Pesquisa: Meio Ambiente na Indústria de Petróleo, Natal – RN, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Ribeiro da Silva

Co-orientador: Dr^a. Márcia Teresa S. Lutterbach

RESUMO

Os biofilmes são formas de associação microbiana responsáveis por gerar, acelerar e/ou induzir o processo de corrosão. Os danos gerados na indústria de petróleo por esse tipo de corrosão são significativos, representando grandes investimentos para seu controle. O objetivo desse trabalho foi avaliar em testes tipo antibiograma os efeitos dos extratos de *Jatropha curcas* e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre microrganismos isolados de amostras de água e, a partir de então, selecionar o produto natural mais efetivo para posterior avaliação sobre biofilmes formados em sistema dinâmico. Os extratos de *J. curcas* não foram eficientes sobre a inibição completa do crescimento microbiano em testes tipo antibiogramas, sendo o óleo essencial mais efetivo e determinado para os demais testes. Uma concentração padrão do óleo essencial de 20 µL foi escolhida e estabelecida para a avaliação sobre os biofilmes e sobre a taxa de corrosão. O efeito biocida foi determinado pela contagem microbiana de cinco tipos de microrganismos: bactérias aeróbicas, precipitadoras de ferro, anaeróbicas, redutoras de sulfato (BRS) e fungos. A taxa de corrosão foi calculada por perda de massa. Identificação molecular e micrografias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas. Os dados mostraram redução a zero do número mais provável (NMP) de bactérias precipitadoras de ferro e BRS a partir de 115 e 113 minutos de contato, respectivamente. Também houve inibição sobre fungos, reduzindo para zero a taxa de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de 74 minutos de exposição. Entretanto, para bactérias aeróbicas e anaeróbicas não houve diferença significativa para o tempo de exposição com o óleo essencial, permanecendo constante. A taxa de corrosão também foi influenciada pela presença do óleo. O óleo essencial de *L. gracilis* Schauer mostrou-se potencialmente efetivo.

Palavras-chave: Biofilme, biocorrosão, *Lippia gracilis* Schauer, biocida e corrosão.

ABSTRACT

The biofilms microbial forms of association are responsible for generating, accelerating and / or induce the process of corrosion. The damage generated in the petroleum industry for this type of corrosion is significant, representing major investment for your control. The aim of this study was to evaluate such tests antibiograms the effects of extracts of *Jatropha curcas* and essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on microorganisms isolated from water samples and, thereafter, select the most effective natural product for further evaluation of biofilms formed in dynamic system. Extracts of *J. curcas* were not efficient on the complete inhibition of microbial growth in tests type antibiogram, and essential oil of *L. gracilis* Schauer most effective and determined for the other tests. A standard concentration of essential oil of 20 μ L was chosen and established for the evaluation of the biofilms and the rate of corrosion. The biocide effect was determined by microbial counts of five types of microorganisms: aerobic bacteria, precipitating iron, total anaerobic, sulphate reducers (BRS) and fungi. The rate of corrosion was measured by loss of mass. Molecular identification and scanning electron microscopy (SEM) were performed. The data showed reduction to zero of the most probable number (MPN) of bacteria precipitating iron and BRS from 115 and 113 minutes of contact, respectively. There was also inhibited in fungi, reducing to zero the rate of colony-forming units (CFU) from 74 minutes of exposure. However, for aerobic and anaerobic bacteria there was no significant difference in the time of exposure to the essential oil, remaining constant. The rate of corrosion was also influenced by the presence of oil. The essential oil of *L. gracilis* was shown to be potentially effective.

Key-words: Biofilm, biocorrosion, *Lippia gracilis* Schauer, biocid and corrosion.

*“Só conseguimos alcançar a imensidão do universo quando somos guiados
por astros estelares denominados Amigos!”*

(Marcelino G. Viana)

Dedico este trabalho a toda a minha família, em especial aos meus pais Maria Rocilda Viana e Francisco de Assis Viana (*in memoria*), responsáveis pela formação do meu caráter e inspiradores da minha vocação, e aos meus “astros estelares” Cynthia Cavalcanti de Albuquerque e Márcia Teresa Lutterbach.

AGRADECIMENTOS

À minha preciosa e compreensiva Mãe, pelo apoio eterno e pelo imenso carinho sempre ofertado em todas as horas, minha gratidão!

À toda a minha família e aos meus queridos irmãos Gevildo Viana, Gecildo Viana, Maria de Conceição Viana e Francisca Rogecilda Viana, pelas inúmeras ajudas e pelo apoio sempre concedido, o meu muito obrigado!

Aos meus grandes amigos Cynthia Cavalcanti de Albuquerque e Josildo Barbosa, pelo imenso apoio e estímulos ilimitados, fica aqui a minha eterna gratidão!

À minha orientadora e amiga Dr^a. Márcia Lutterbach, por ter acreditado e apostado no meu potencial, a você a minha admiração e meu muito obrigado pela realização de um sonho, o qual sem você não seria possível!

Ao professor Dr. Djalma Ribeiro da Silva, pela orientação!

Às pesquisadoras do Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO): Mariana Galvão, Dr^a. Luciana Contador, Ana Lúcia e Viviane, pela imensa paciência e ajuda concedida em todos os experimentos, além da troca de experiência, o meu eterno obrigado!

Aos meus queridos amigos André e Elisa, pelos bons papos, agradável companhia e imensa ajuda durante os meus experimentos, o meu obrigadão!

À minha grande amiga Sylviane Charrete, pela companhia agradável, ajuda concedida, conselhos e experiências compartilhadas durante a minha estadia no LABIO, a minha imensa gratidão!

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Corrosão (LACOR) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT): Carlinha, Milagros, Loreta, Felicle, Gustavo, Ana Carolina, Mário, Thaís, Letícia, Fernanda, Sônia Coelho, Eduardo, Vera, Denise, Zezinho, Regininha e Lili, pela ajuda e carinho, meu muito obrigado!

Às queridas secretárias do LACOR: Sônia e Lígia, obrigado pelas boas risadas e ajuda!

Às amigas Dr^a. Helga e Lisiane, pelas boas risadas e pela ajuda concedida com os ensaios de corrosão, muito obrigado!

À chefe do LACOR Dra. Olga, pela recepção e consentimento do espaço, minha gratidão!

Ao amigo e pesquisador Ricardo Bonélio, pelo bom papo e conselhos, minha admiração e gratidão!

Aos meus grandes amigos: Wagner e Verônica, pela ajuda, apoio e convivência compartilhada no Rio, minha eterna gratidão!! Sem vocês a realização desse sonho teria sido mais difícil!!

À professora Dr^a. Tereza Neuma de Castro Dantas, obrigado pela orientação, atenção e apoio!

À Pró-reitora de Pós-Graduação Prof^a. Edna e a querida Dalva, pela ajuda e por ter acreditado em mim, meu muito obrigado!

Ao professor da UERN Dr. Jaécio, pela ajuda na extração química do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer.

Ao pesquisador Dr. Marcos Drummond, pelo fornecimento das sementes de Pinhão Manso;

Ao Dr. Claudio Camara da UFRPE, pela ajuda com as análises com o óleo essencial de *L. gracilis* Schauer;

À amiga Dr^a. Érika Medeiros, pela ajuda com a análise estatística, meu muito obrigado!

À professora Dr^a. Gorete Macêdo do Departamento da Engenharia Química, pela atenção e apoio!

Ao Engenheiro Gutemberg de Souza Pimenta do CENPES/PETROBRAS - RJ, pela compra do sistema dinâmico e pelo fornecimento da água, muito obrigado!

À Dr^a. Gelsa Edith N. Hidalgo da UFRGS, pela realização das Micrografias Eletrônicas de Varredura, obrigado!

A todos os meus amigos, colegas e conhecidos, por ter de certa forma ajudado, apoiado e participado dessa conquista, meu muito obrigado!

À CAPES, pelo apoio financeiro e o incentivo à pesquisa;

Por último, mas não menos importante, agradeço ao meu maravilhoso Deus e a minha virgem Maria, por ter proporcionado a honra de colocar todas essas pessoas na minha vida, e por estar sempre presente na minha vida nas horas mais difíceis e também prazerosas! Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Imagens de biofilmes. Fonte: Centers de Disease Control and Prevention (CDC), 2002	6
Figura 2.2: Ilustração das cinco principais fases de formação e desenvolvimento do biofilme. Bott (1993).....	10
Figura 2.3: Ilustração do modelo atual de biofilme segundo Lewadouski (1995) dando ênfase a presença de canais de fluxo. (Adaptado de Center for Biofilm Engineering – Montana State University/ Bozeman, 1996)	12
Figura 2.4: Modelo de desenvolvimento de biofilme enfocando a influência genética. Adaptado de Singh <i>et al.</i> (2006)	13
Figura 2.5: Ciclo biológico do enxofre evidenciando os processos de oxidação e redução. Adaptado de Tang <i>et al.</i> , 2009	31
Figura 2.6: Diagrama esquemático de uma superfície catódica em um processo de corrosão anaeróbica, no qual o H^+ é reduzido para H sobre a superfície do metal. (Jack, 2002)	32
Figura 2.7: Eletroquímica da biocorrosão: a) célula de aeração diferencial formada pelo acúmulo de microrganismos em biofilme e b) micrografia de um <i>pite</i> provocado por microrganismos	35
Figura 2.8: Diagrama esquemático do possível processo que pode ocorrer durante a formação do <i>pite</i> pela atividade biológica dos microrganismos de acordo com Javaherdashti (2006)	36
Figura 2.9: Esquema de PCR mostrando os ciclos de desnaturação do DNA, alinhamento e polimerização a partir de <i>primers</i> (P2) em diferentes estados de temperatura, resultando na produção de novas moléculas de DNA (A)	42
Figura 2.10: Moléculas de terpenos carvacrol e timol	52
Figura 2.11: Imagens da planta inteira, da folha e das sementes de Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>). Fonte: www.pinhaomanso.com.br	54
Figura 4.1: Amostras de água de produto do tanque: (a) fornecida diretamente do CENPES sem filtração e (b) após filtração com gaze estéril	66

Figura 4.2: Teste de detecção de fungos: (a) adição da amostra em placas de Petri e (b) posterior adição do meio de cultura ágar nutriente	67
Figura 4.3: Teste de detecção de bactérias anaeróbicas: (a) retirada de amostras de água por seringa estéril e (b) inoculação em recipiente tipo penicilina com meio de cultura específico para a detecção de microrganismos anaeróbicos	67
Figura 4.4: Placas de Petri contendo meio ágar nutriente: (a) antes e (b) depois da inserção dos discos de papel filtro com os diferentes produtos naturais	71
Figura 4.5: Isolamento das colônias de bactérias aeróbicas feito por estriação	75
Figura 4.6: Preparação dos biocupons: (a) cupom de aço carbono 1020 ASTM utilizado no experimento, (b) aparelho ultrason Ultra Cleaner 1600A [®] e (c) cupons imersos em dicloroetileno em banho ultrason	77
Figura 4.7: Imagens do sistema dinâmico feito em acrílico antes do início do experimento: (a) com destaque para o dispositivo para a fixação dos cupons, (b) cheio de água, (c) em funcionamento conectado a uma bomba e (d) os cupons de aço carbono já inseridos no seu interior	79
Figura 4.8: Esquema mostrando a forma de submissão dos biocupons com biofilme ao tratamento com o óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> Schauer em Erlenmeyer	80
Figura 4.9: Raspagem de biofilme: (a) biofilme sendo raspado do cupom sob placa de Petri e (b) retirada do excesso com solução salina	81
Figura 5.1: Detecção microbiana: (a) Presença de bactérias aeróbicas detectada pela turvação do meio comparado ao controle, (b) fungos, e de (c) bactérias precipitadoras de ferro detectadas pela turvação do meio devido a formação do precipitado de ferro (coloração escura)	89
Figura 5.2: Presença de BRS detectada pela formação de sulfeto ferroso (SFe)	89
Figura 5.3 – Ensaio de avaliação do grau de contaminação microbiológica: (a) controle, (b) óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer, (c) extrato hexânico e (d) metanólico de <i>J. curcas</i>	91
Figura 5.4: Antibiograma com o óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer: (a) controle (sem adição do óleo) e (b e c) discos com o óleo essencial formando amplos halos de inibição	92
Figura 5.5: Antibiograma com os extratos de <i>J. curcas</i> : (a) controle, (b) extrato	

hexânico e (c) metanólico	93
Figura 5.6: Antibiogramas com os diferentes produtos naturais comparados ao controle: (a) ação do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer, (b) do extrato hexânico e (c) metanólico de <i>J. curcas</i>	94
Figura 5.7: Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI): (a) concentração de 15 µL, (b) 20 µL e (c) 25 µL, comparadas com o controle	98
Figura 5.8 – Aspectos morfológicos das colônias bacterianas isoladas a partir do teste da CMI	101
Figura 5.9: Lâmina de coloração de Gram: (a) microscopia geral das bactérias e (b) detalhe de uma bactéria, visualizando a forma de bacilo e a sua coloração violeta	101
Figura 5.10: Extração de DNA: (a) Fragmento de DNA extraído e (b) produtos da PCR do gene de RNA 16S	102
Figura 5.11. Unidade formadora de colônias (UFC) de fungos retirados de biofilmes submetidos à crescentes tempos de contato com 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	105
Figura 5.12. Número mais provável (NMP) de bactérias redutoras de sulfato (BRS) retiradas de biofilmes submetidos à crescentes tempos de contato com 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	106
Figura 5.13. Número mais provável (NMP) de bactérias precipitadoras de ferro retiradas de biofilmes submetidos à crescentes tempos de contato com óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	107
Figura 5.14: Micrografias eletrônicas de varredura: a) biofilme em cupom de aço carbono formado após sete dias em sistema dinâmico; b) após imersão em 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	109
Figura 5.15: Micrografias eletrônicas de varredura evidenciando a presença de sais derivados do processo de corrosão: a) aumento de 5351 vezes e b) 10100 x	110
Figura 5.16: Cupons de aço carbono 1020 ASTM: a) fotografias e b) microscopias antes e após a retirada do sistema dinâmico, respectivamente	111
Figura 5.17: Taxa de corrosão dos biocupons de aço carbono 1020 ASTM submetidos a diferentes tempos de contato com 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Alguns tipos de biocidas e seus respectivos mecanismos de ação sobre os diferentes “alvos” na célula microbiana (Myers,2008)	47
Tabela 4.1: Composição química dos meios de cultura Postgate E modificado e Fluido ao tioglicolato	68
Tabela 4.2: Composição química do meio de cultura Citrato férrico, Saborround e Caldo nutriente	69
Tabela 5.1: Taxas de rendimento de duas amostras do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer e dos extratos hexânico e metanólico de <i>J. curcas</i>	86
Tabela 5.2: Composição química do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer de diferentes períodos de extração (2003 e 2009)	88
Tabela 5.3: Contagem de microrganismos obtida pelo método do NMP para as diferentes amostras de água	90
Tabela 5.4 – Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer em meio ágar nutriente (amostra de 2003)	96
Tabela 5.5: Efeito das duas amostras do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer sobre o crescimento bacteriano em meio ágar nutriente	97
Tabela 5.6: Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer (amostra de 2003) em meio ágar nutriente	98
Tabela 5.7: Taxa de corrosão dos biocupons de aço carbono 1020 ASTM submetido a diferentes tempos de contato com 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	100
Tabela 5.8: Taxa de corrosão dos biocupons de aço carbono 1020 ASTM submetidos ao tratamento com 20 µL do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer em diferentes tipos de solução após sete dias sob agitação	111

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

CIM – Corrosão induzida microbiologicamente

CMI – Concentração mínima inibitória

UFC – Unidade formadora de colônia

NMP – Número mais provável

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

mL – Mililitro

pH – Potencial de hidrogeniônico

cm² – Centímetro quadrado

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrofotômetro de Massa

CG/FID – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

B.O.D – Demanda bioquímica de oxigênio

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

RNA – Ácido Ribonucléico

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

m.m.a – Milímetro por ano

NACE – *National Association of Corrosion Engineers*

ppm – Partículas por milhão

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	x
1 – Introdução Geral	1
1.2 – Objetivos específicos	4
2 – Aspectos teóricos fundamentais	5
2.1 – Biofilmes microbianos	6
2.1.1 – Definição e constituição dos biofilmes	6
2.1.2 – Formação do biofilme	9
2.1.3 – Principais características e fatores que influenciam seu desenvolvimento	14
2.1.3.1 – Tipo e características do substrato	15
2.1.3.2 – Característica do meio aquoso	15
2.1.3.3 – Hidrodinâmica do fluido	16
2.1.3.4 – Propriedades das células	17
2.1.3.5 – Características genéticas (regulação genética)	18
2.1.3.6 – Concentração eletrolítica e forças físico-químicas	19
2.1.3.7 – Presença de material particulado	19
2.1.3.8 – Presença de agentes antimicrobianos	20
2.1.4 – Importância dos biofilmes	20
2.2 – Corrosão Microbiológica	23
2.2.1 – Corrosão	23
2.2.1.1 – Definição de corrosão	23
2.2.1.2 – Tipos de corrosão	25
2.2.1.3 – Corrosão localizada	25
2.2.2 – Corrosão microbiológica	26
2.2.2.1 – Definição e histórico	26
2.2.2.2 – Tipos de microrganismos e seus mecanismos envolvidos na biocorrosão	27
2.2.2.2.1 – Bactérias aeróbicas	28
2.2.2.2.2 – Bactérias precipitadoras de ferro	29
2.2.2.2.3 – Bactérias anaeróbicas	30
2.2.2.2.4 – Bactérias redutoras de sulfato (BRS)	30
2.2.2.2.5 – Fungos	34
2.2.2.3 – Eletroquímica da Corrosão Microbiológica	35
2.2.2.4 – Detecção e monitoramento da corrosão microbiológica	37
2.2.2.4.1 – Métodos de amostragem de microrganismos	38
2.2.2.4.2 – Métodos microscópicos de detecção	39
2.2.2.4.2.1 – Uso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
2.2.2.4.3 – Monitoramento através da Biologia Molecular	41
2.2.2.5 – Métodos de controle da biocorrosão	44
2.2.2.5.1 – Biocidas	44
2.2.2.5.1.1 – Classificação	45
2.2.2.5.1.2 – Mecanismos de ação dos biocidas	46
2.2.2.5.1.3 – Fatores que interferem na ação do biocida	47

2.2.3 – Produtos Naturais: possíveis métodos de controle	48
2.2.3.1 – O gênero <i>Lippia</i>	48
2.2.3.1.2 – A espécie <i>Lippia gracilis</i> Schauer	49
2.2.3.1.2.1 – O óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	50
2.2.3.2 – O gênero <i>Jatropha</i>	52
2.2.3.2.1 – A espécie <i>Jatropha curcas</i> L.	53
2.2.3.2.1.1 – O óleo de <i>J. curcas</i>	55
3 – Estado da Arte	58
3.1 – Uso de produtos naturais no controle da biocorrosão	58
4 – Metodologia Experimental	63
4.1 – Obtenção e caracterização dos produtos naturais	63
4.1.1 – Coleta da espécie <i>L. gracilis</i> Schauer	63
4.1.2 – Processo químico de obtenção do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	63
4.1.3 – Caracterização química do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	63
4.1.4 – Preparação dos diferentes extratos de <i>J. curcas</i>	64
4.1.4.1 – Obtenção e tratamento das sementes de <i>J. curcas</i>	64
4.1.4.2 – Processo de extração	65
4.2 – Ensaio microbiológicos com os produtos naturais	65
4.2.1 – Local de realização dos ensaios	65
4.2.2 – Detecção e isolamento dos microrganismos	66
4.2.2.1 – Análise da água em teste de diluição e contagem dos microrganismos planctônicos Presentes	70
4.2.3 – Avaliação dos produtos naturais em testes tipo antibiogramas	70
4.2.3.1 – Antibiogramas	71
4.2.3.1.1 – Teste de contaminação microbiológica dos produtos naturais	71
4.2.3.1.2 – Antibiograma por swab	72
4.2.3.1.3 – Antibiograma pelo método de diluição	72
4.2.3.1.4 – Antibiograma com alça de Drigalski	73
4.2.4 – Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	73
4.2.5 – Identificação dos microrganismos	74
4.2.5.1 – Análise das características macroscópicas	74
4.2.5.2 – Coloração de Gram	75
4.2.5.3 – Métodos biomoleculares de identificação	75
4.2.6 – Ensaio experimental em sistema dinâmico	76
4.2.6.1 – Preparação dos biocupons	77
4.2.6.2 – Montagem do sistema dinâmico	78
4.2.6.3 – Avaliação microbiológica	80
4.2.6.3.1 – Contagem microbiana	81
4.2.6.3.2 – Análise estatística	82
4.2.6.4 – MEV	82
4.2.6.5 – Ensaio de corrosão	83
4.2.6.5.1 – Análise da influência do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer sobre a taxa de corrosão	83
5 – Resultados e Discussão	85
5.1 – Rendimento do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer e dos diferentes extratos de <i>J.</i> <i>curcas</i>	86
5.2 – Caracterização química das diferentes amostras do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer	87

5.3 – Ensaio microbiológicos	89
5.3.1 – Teste de detecção dos microrganismos	89
5.3.2 – Contagem dos microrganismos planctônicos	90
5.3.3 – Grau de contaminação microbiológica dos produtos naturais	91
5.4 – Avaliação qualitativa da ação microbiana dos produtos naturais	92
5.4.1 – Efeito sobre bactérias aeróbicas	92
5.4.2 – Efeito sobre bactérias precipitadoras de ferro	93
5.4.3 – Efeito sobre bactérias anaeróbicas	95
5.5 – Obtenção da CMI	96
5.6 – Identificação bacteriana	100
5.6.1 – Morfologia e aspectos bacterianos	100
5.6.2 – Coloração de Gram	101
5.6.3 – Identificação biomolecular	102
5.7 – Avaliação biocida do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> Schauer e seu efeito sobre a taxa de corrosão	104
5.7.1 – Ensaio microbiológico	104
5.7.2 – MEV	109
5.7.3 – Ensaio de corrosão	110
6 – Conclusões	116
7 – Referências	119

Capítulo 1

Introdução Geral

1 – Introdução Geral

Os microrganismos constituem uma das mais extraordinárias formas de vida, seja pela sua grande capacidade de adaptação ou pela sua capacidade de reproduzirem-se amplamente em um curto período de tempo. Estes aspectos contribuem para que se distribuam na grande maioria dos habitats do planeta e apresentem uma grande diversidade genética, além de metabólica.

Estas implacáveis formas de vida resistem às mais diversificadas condições ambientais: toleram altas temperaturas, sobrevivem a ambientes com ou sem oxigênio, utilizam energia de diferentes fontes, incluindo elementos como sulfatos, sulfetos e íons amoniacais, além de apresentarem uma grande relação superfície-volume.

Do mesmo modo que possuem uma ampla distribuição no meio ambiente, são diversas as formas que podem se fazer presentes para habitar o mesmo. Podem estar isolados, em colônias ou em associações complexas com diferentes tipos de espécies, formando um microecossistema denominado de “biofilme”.

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida sésil adotada pelos microrganismos e a primeira descrição detalhada da adesão microbiana em superfície foi feita por Zobell (1943), mas a palavra biofilme foi introduzida na literatura científica só em 1970 (Costerton *et al.*, 1987). Atualmente, o termo biofilme é definido como complexos ecossistemas microbiológicos, embebidos em uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido. Os biofilmes, também definidos como “filmes microbianos”, são formados por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas, substâncias dissolvidas e adsorvidas.

Os biofilmes apresentam algumas importâncias benéficas, como por exemplo: a sua utilização em bioreatores para a produção de fermentados, o uso de agregados microbianos em tratamento aeróbios e anaeróbios de efluentes domésticos e industriais. A remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos também pode ser realizada pela ação dos biofilmes (Takasaki *et al.*, 1992). Por outro lado, os biofilmes estão inteiramente envolvidos no processo de Corrosão Influenciada Microbiologicamente (CIM) que atinge vários setores da indústria petrolífera, como também das indústrias química,

petroquímica, civil, naval, automobilística, alimentícia, de papel e aeronáutica, sendo responsável por grandes prejuízos de ordem econômica.

Este tipo de corrosão é provocado pela presença de microrganismos na superfície de metais e seus processos metabólicos, que modificam as condições eletroquímicas da interface metal solução, alterando em particular o valor do pH, a concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de componentes orgânicos e inorgânicos. Os principais mecanismos que favorecem o aparecimento da corrosão pela ação microbiana são: a influência direta na velocidade das reações anódicas e catódicas pela produção de metabólitos e a formação de tubérculos que geram a formação de uma célula de aeração diferencial, o que proporciona uma rápida dissolução metálica (Videla, 2003).

A existência de grandes prejuízos econômicos em diferentes setores industriais causados por esse tipo de corrosão leva à necessidade de se buscar métodos de controle efetivos. Compostos denominados de “biocidas”, substâncias químicas com atividade antimicrobiana, são amplamente utilizados nos diversos setores das indústrias, principalmente na indústria de petróleo. Estes podem ser orgânicos ou inorgânicos e devem apresentar alguns requisitos importantes para a sua aplicação, como: ser seletivo, não ser corrosivo para os metais dos sistemas, possuir adequada biodegradabilidade e apresentar baixo custo. Entretanto, em alguns casos o uso de biocidas acaba não sendo eficiente para inibir a proliferação dos microrganismos presentes, além de apresentar um alto custo e não possuírem biodegradabilidade adequada.

Considerando estes fatos, novos métodos de controle com baixo custo, ausência de riscos ao meio ambiente e com ação efetiva, estão sendo pesquisados para o interesse da indústria. Atualmente, o uso de produtos naturais obtidos a partir de plantas pode se tornar uma alternativa de controle potencialmente efetiva para esse tipo de corrosão, já que são considerados ambientalmente corretos. Duas espécies típicas do Nordeste brasileiro mostraram-se com potencial antimicrobiano já relatado na literatura: *Jatropha curcas*, espécie de leguminosa conhecida popularmente como pinhão manso, e *Lippia gracilis* Schauer, conhecida como alecrim da chapada (Kumar e Sharma, 2008; Pascual *et al.*, 2001).

O gênero *Jatropha* pertence à família *Euphorbiaceae* e inclui aproximadamente mais de 170 espécies já conhecidas, distribuídas principalmente entre as Américas Central e do Sul, África, Índia e Sudoeste da Ásia. As espécies desse gênero apresentam diversas atividades funcionais, como atividade antiviral, antitumoral e antimicrobiana, já avaliadas. Também

caracterizam-se pela grande quantidade de óleo viscoso presente nas suas sementes, que pode ser usado na produção de velas, sabão, parafina, cosméticos e, principalmente, como combustível (Foidl e Kashyap, 1999).

Atualmente, o óleo presente na semente da espécie *J. curcas* tem sido pesquisado para utilização como biodiesel. A presença de substâncias tóxicas como a curcina A, além de inibidores de tripsina, também presentes nas sementes, podem conferir atividade antimicrobiana aos extratos de *J. curcas*, tendo em vista que estas substâncias já confirmaram possuir efeito contra microrganismos (Kumar & Sharma, 2008).

O gênero *Lippia* pertence à família *Verbenaceae*, incluindo aproximadamente 250 espécies entre plantas herbáceas, arbustos e árvores. As espécies são distribuídas principalmente entre as Américas Central e do Sul e no território Africano. Em geral, o gênero apresenta atividade farmacológica e é amplamente utilizado na medicina popular. A maioria das espécies é tradicionalmente utilizada como remédios gastrointestinais e respiratórios, porém algumas delas apresentam atividade antimalarial, citoestática e antimicrobiana. As plantas do gênero caracterizam-se pela presença de óleos essenciais em tricomas glandulares localizados nas folhas. Esses óleos exibem forte atividade contra bactérias, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*, gêneros formadores de biofilmes, e contra fungos dermatofíticos (Pascual *et al.*, 2001). Esta atividade em algumas espécies do gênero deve-se à presença de timol e carvacrol, monoterpenos fenólicos.

Lippia gracilis Schauer, popularmente conhecida como alecrim da chapada, é uma espécie nativa do Nordeste brasileiro que apresenta elevados conteúdos de timol e carvacrol, e seu óleo apresenta atividade antibacteriana e antifúngica já comprovada (Albuquerque *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais com atividade antimicrobiana são inofensivos às pessoas e ao ambiente e são considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência a microrganismos patogênicos. Uma vantagem adicional dos voláteis naturais é ausência de resíduos após o tratamento, e também a sua característica lipofílica que interage com a membrana microbiana, facilitando a inibição dos microrganismos (Reddy *et al.*, 1998).

Dessa forma, o uso dessas espécies citadas mostra-se como uma possível alternativa contra biofilmes. Aliado a esse fator, o baixo custo na extração do óleo de *L. gracilis* Schauer

e a grande ascensão da produção de *J. curcas* na região Nordeste para a produção do biodiesel, tornam-se fatores ainda mais favoráveis para os seus usos.

Assim, na perspectiva de alcançar novos métodos de controle que possuam baixo valor econômico, ausência de restrições ambientais e uma ampla ação efetiva sobre o processo de biocorrosão, que o presente trabalho se desenvolveu, objetivando avaliar em testes tipo antibiograma os efeitos dos extratos hexânico e metanólico de *J. curcas* e do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer sobre microrganismos isolados de amostras de água do produto do tanque e, a partir de então, selecionar o produto natural mais efetivo para posterior avaliação sobre biofilmes formados em sistema dinâmico.

1.1 – Objetivos Específicos

- Avaliar, inicialmente, em testes tipo antibiograma os efeitos dos extratos de *J. curcas* e do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer sobre microrganismos isolado a partir de água e selecionar o produto natural mais efetivo a partir do seu halo de inibição;
- Avaliar, *in vitro*, diferentes concentrações do produto natural mais efetivo em antibiograma e selecionar a sua Concentração Mínima Inibitória (CMI);
- Avaliar o efeito da CMI do produto natural selecionado sobre os microrganismos presentes em biofilmes submetidos a diferentes períodos de tempo de contato;
- Observar o efeito do produto natural escolhido sobre biofilmes formados em aço carbono através de microscopias eletrônicas de varredura (MEV);
- Avaliar por perda de massa a influência do produto natural na taxa de corrosão.

Capítulo 02

Aspectos Teóricos Fundamentais

2. Aspectos Teóricos Fundamentais

2.1 - Biofilmes Microbianos

2.1.1 – Definição e constituição dos biofilmes

A descoberta do biofilme (Figura 2.1) aconteceu no início de 1674 pelo cientista, pai da Microbiologia, Antonie van Leeuwenhoek, quando pela primeira vez, observou por um primitivo microscópico um conjunto de microrganismos que habitavam uma superfície dentária vivendo em associação, os quais ele denominou de “animálculos”. A partir de então, acreditou-se na existência de uma forma de associação complexa e diferenciada. Mas só em 1970 a palavra biofilme foi introduzida na literatura científica para definir essa forma de associação (Costerton *et al.*, 1987).

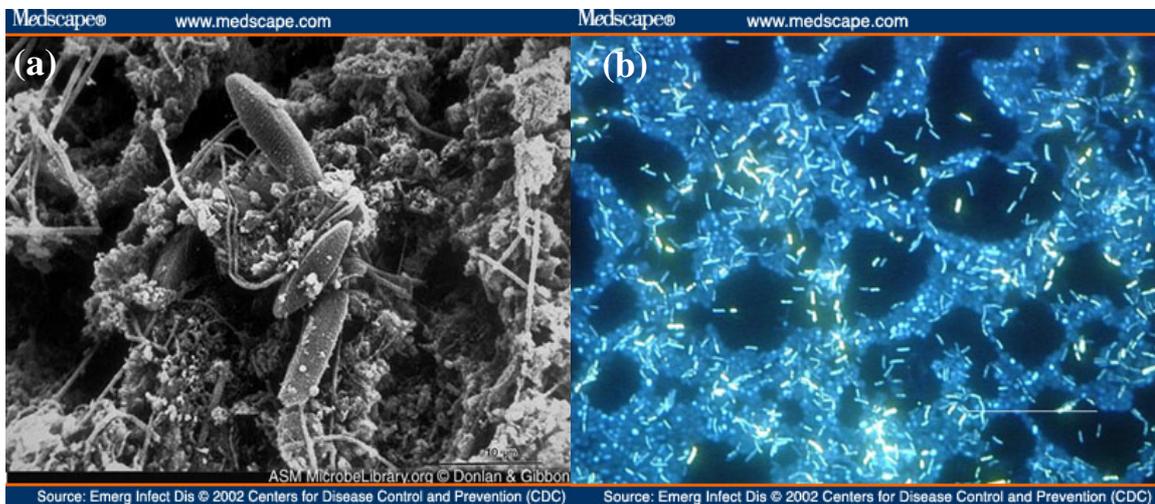


Figura 2.1: Imagens de biofilmes: (a) crescendo em superfície de aço após oito semanas de imersão em sistema de água industrial examinado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e (b) após 14 dias de imersão em sistema de água potável examinado por Microscopia de Epifluorescência (ME). Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002.

A definição de biofilme é vasta e variada, mantendo-se nos seus mais variados conceitos apenas as suas características peculiares. Na literatura atual o termo biofilme vem sendo definido como uma acumulação de células microbianas que atacam a superfície abiótica ou biótica, cuja formação só ocorre quando há um fluxo de nutrientes suficiente (Singh *et al.*, 2006). Pode também ser definido como uma comunidade microbiológica sésil, derivada e caracterizada por células que atacam uma interfase embebida em uma matriz de exo-polissacarídeo com alteração fenotípica (Pereira, 2001).

Dando ênfase a este conceito, Garrett (2008) define mais especificamente o conceito de biofilme como sendo um conjunto de poucas bactérias co-aderidas em um substrato por meio de propriedades físicas e pelas substâncias poliméricas extracelulares.

Os biofilmes são constituídos por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que representam cerca de 70 a 90% do seu total, além de água, partículas retidas, adsorvidas e dissolvidas, e microrganismos que constituem pequena parte da sua composição, representando menos de 10% do seu total (Flemming, 1993). Essa composição percentual de microrganismos e substâncias poliméricas extracelulares varia dependendo das espécies envolvidas na formação do biofilme. Também possuem partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos.

Vários tipos de microrganismos podem estar presentes nos biofilmes, como microalgas, fungos, protozoários, vírus e bactérias. Em um biofilme “maduro” formado em um aço estão presentes microrganismos com diferentes metabolismos de respiração. Os microrganismos anaeróbicos, por exemplo, ficam localizados próximo a região de interfase entre o biofilme e o aço. Por outro lado, microrganismos facultativos aeróbicos localizam-se no meio da matriz polimérica e já os aeróbicos gerais, ficam nas proximidades da interfase biofilme/solução (Peréz *et al.*, 2007).

As bactérias são os microrganismos que mais frequentemente produzem os biofilmes, devido possuírem características peculiares como: reduzido tamanho, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares. Cerca de 99% das populações de bactérias mundiais são encontradas na forma de biofilmes em diferentes estágios de crescimento, sendo as mais comuns *Pseudomonas*

aeruginosa, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *Micrococcus sp*, *Enterococcus faecium*, várias espécies do gênero *Desulfovibrio* (Macêdo, 2000; Pereira, 2001).

As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) possuem estruturas complexas e heterogêneas. São constituídas principalmente de polissacarídeos ou proteína, substâncias húmicas, ácidos nucleicos (DNA ou RNA), fosfolipídeos, glicoproteínas e ácidos urônicos, sendo sintetizada pela ação da enzima polimerase (Costerton *et al.*, 1987). Nas bactérias Gram negativas os polissacarídeos constituintes do EPS são principalmente polianiônicos, o que confere uma propriedade exclusivamente aniônica. Essa propriedade permite a associação de cátions divalentes como cálcio e magnésio. Já nas bactérias Gram positivas o caráter passa a ser primariamente catiônico.

O EPS apresenta duas importantes características que influenciam diretamente a estrutura física e espacial do biofilme. A primeira enfatiza que a composição e a estrutura dos polissacarídeos determinam a conformação inicial do biofilme. Por exemplo, bactérias que apresentam resíduos de hexoses com a estrutura 1,3 ou 1,4- β -hexoses tendem a configurar o biofilme como mais rígido, menos deformado, mais solúvel ou insolúvel. A outra característica enfatiza que o EPS não é uniforme, mas pode variar espacialmente e temporariamente (Sutherland, 2001).

O EPS é considerado peça fundamental para o início e manutenção da corrosão e é responsável pela agregação dos microrganismos presentes no biofilme, conferindo-os maior resistência à ação de agentes químicos e físicos. Um dos pontos que favorece essa resistência relaciona-se ao seu caráter, em sua grande maioria, aniônico de muitos polissacarídeos presentes nos biofilmes, que propicia o aprisionamento de cátions presentes em alguns compostos químicos, diminuindo assim a sua concentração e, portanto, diminuindo a sua ação nociva aos microrganismos presentes (Almeida, 2002). Além da proteção contra a ação dos biocidas, o EPS é também responsável pela sua morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional.

Devido a esses fatores, a ação dos biocidas objetiva-se exatamente na destruição ou ruptura da estrutura do EPS, o que contribui para a plena desintegração do biofilme, já que os microrganismos aderidos e envolvidos pelo o EPS apresentam uma maior resistência à ação dos sanificantes. Pesquisas comprovaram que microrganismos aderidos foram entre 150 a 3000 vezes mais resistentes à ação do biocida ácido hipocloroso que os microrganismos não aderidos (Macêdo, 2000).

Vários fatores influenciam a produção de EPS no biofilme. Entretanto, os mais importantes são: a quantidade de nutrientes presente no meio, o grau de ação do biofilme e o estado em que esse se encontra, em um ambiente com ou sem *stress* (Donlan, 2002).

2.1.2 – Formação do biofilme

Várias são as teorias para explicar a formação do biofilme. A primeira foi proposta por Marshall *et al.*, em 1971, enfocando que a adesão é um processo que ocorre em duas fases: a primeira fase é considerada ainda um processo reversível, em função do processo de adesão dos microrganismos na superfície ocorrerem por forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e atração eletrostática. Durante este estágio as bactérias apresentam movimentos Browniano, podendo ser removidas por rinsagem. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica (EPS) produzido pela bactéria. Nesta fase, as fimbrias poliméricas ligam a célula bacteriana ao substrato, tornando difícil a remoção do biofilme, sendo necessário utilizar métodos mecânicos, como lavagem ou raspagens.

Em 1976, Fletcher descreveu o processo de acumulação de microrganismos na superfície em três estágios. O primeiro processo refere-se à adsorção ou acumulação de microrganismos na superfície; o segundo, ao processo de ataque ou consolidação entre a superfície do substrato e os microrganismos, com conseqüente formação dos polímeros extracelulares. O terceiro e último evidencia a colonização, ou crescimento, e divisão de organismos sobre a superfície.

Outra teoria foi formulada por Characklis (1984), que sugere a formação do biofilme dividida em cinco etapas: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico, transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência, início da adesão bacteriana ainda reversível, crescimento celular, colonização e adesão irreversível. Nesta última fase o biofilme já apresenta alta atividade metabólica e libera porções do biofilme localizadas na periferia.

Já para Notermans (1991), a formação do biofilme se dá em três etapas: fixação inicial da bactéria, consolidação da bactéria na superfície e, por fim, a colonização e crescimento da bactéria. Na etapa de consolidação ocorre a produção de material extracelular

que facilita a fixação dos microrganismos. Nesta fase não se consegue retirar as células fixadas por rinsagem.

Entretanto, dentre as diversas teorias a mais aceita foi a defendida por Bott (1993), que considera a formação do biofilme como resultado da agregação de substâncias orgânicas, microrganismos e produtos derivados do próprio metabolismo desses organismos. Esse acúmulo é superficial, seguindo um padrão sigmoidal, sendo o resultado de um balanço entre processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem simultaneamente, não sendo uniforme nem no tempo nem no espaço. Seu desenvolvimento é separado em cinco fases (Figura 2.2):

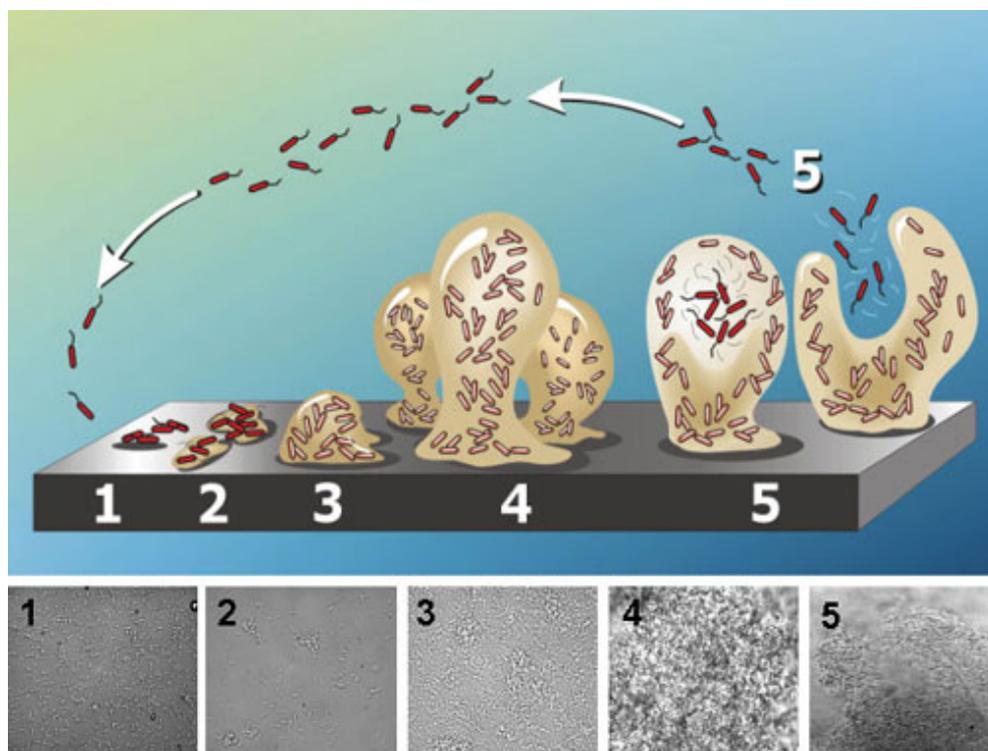


Figura 2.2: Ilustração das cinco principais fases da formação e desenvolvimento do biofilme com suas respectivas micrografias eletrônicas de varredura reais. Bott (1993).

1 - Adsorção das substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contato com o meio aquoso, constituindo-se um filme condicionador;

2- Transporte dos microrganismos e outras partículas do meio aquoso para a superfície sólida acondicionada;

3- Adesão firme dos microrganismos à superfície;

4- Transporte de nutrientes da fase líquida para a interfase líquido-biofilme, bem como no interior do filme microbiano;

5- Produção do biofilme devido o consumo de nutrientes, conseqüentemente crescimento e reprodução dos microrganismos aderidos e síntese de polímeros extracelulares:

a) transporte de subprodutos do biofilme para o exterior,

b) e desprendimento de porções do biofilme devido a fenômenos de erosão superficial ou deslocamento súbito.

Nessa última fase, o desprendimento das porções mais externas dá-se à medida que a espessura do biofilme aumenta e supera a camada-limite de fluxo laminar por efeito do corte de fluxo do líquido. Estabelece-se então um processo contínuo e dinâmico de renovação do biofilme, que depende da espessura do depósito, da velocidade do fluxo de líquido e da velocidade de crescimento dos microrganismos. A consequência dessa fase de desprendimento é a contaminação do meio líquido por partículas biológicas, como: metabólitos, materiais de lise celular e partículas inorgânicas como os próprios produtos da corrosão microbiológica.

Durante a década de 80 e parte dos anos 90, segundo o modelo de barreira difusional, o biofilme foi considerado como uma massa de EPS em que as células microbianas e diversos detritos inorgânicos se encontravam distribuídos mais ou menos regularmente pela matriz polimérica. Entretanto, nos últimos anos foi elaborado um novo modelo diferente de biofilme com o surgimento das medições realizadas a partir de ultramicroeletrodos e o uso da microscopia confocal a laser. Neste novo modelo sugerido inicialmente por Lewandowski (1995) os microrganismos no biofilme formam aglomerados, separados por canais ou túneis onde o transporte de líquido ocorre essencialmente por convecção e é responsável pela distribuição de nutrientes, oxigênio, e pela própria passagem dos agentes sanificantes. São estes os canais responsáveis pela manutenção da estrutura do biofilme (Figura 2.3).

Com o surgimento desse novo modelo conceitual de biofilme a limitação do acesso de alguns biocidas oxidantes e sua menor eficiência sobre microrganismos aderidos ao metal pode ser compreendida.

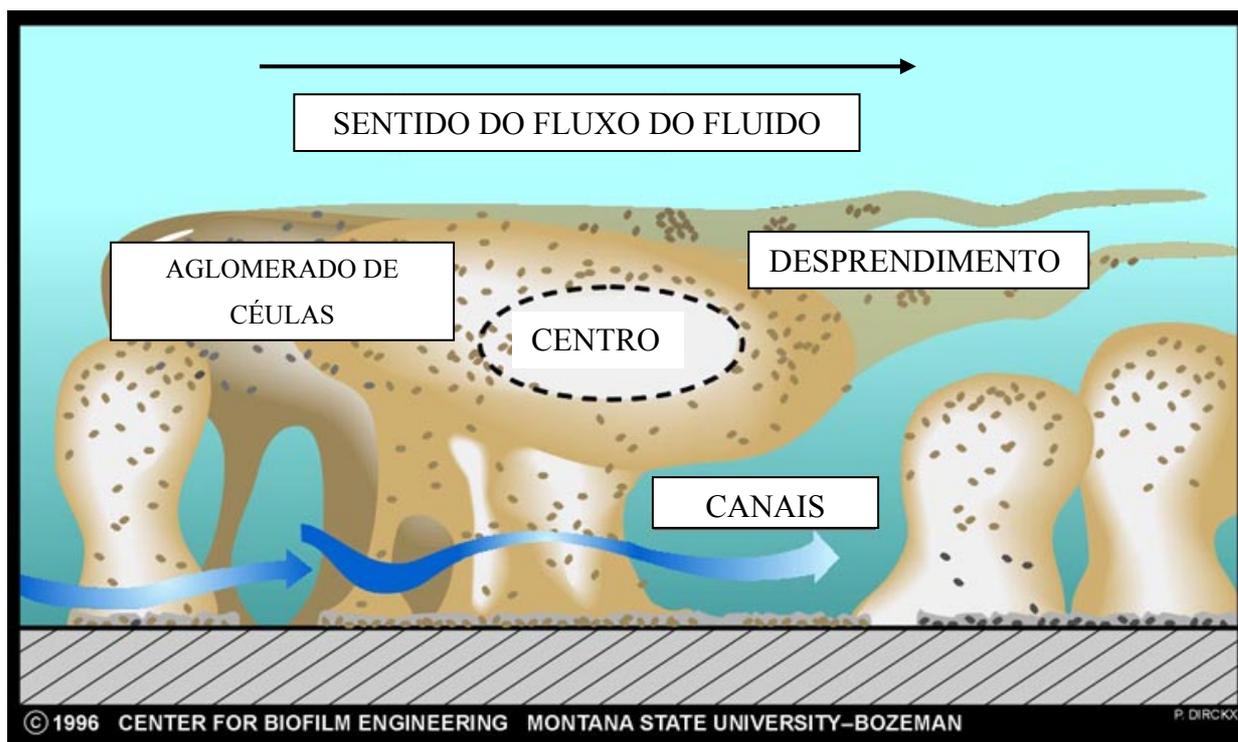


Figura 2.3: Ilustração do modelo atual de biofilme segundo Lewandowski (1995), dando ênfase a presença de canais por onde o fluxo passa. (Adaptado de Center for biofilm engineering – Montana State University/ Bozeman, 1996).

Aliado a este modelo convencional, Singh *et al.* (2006) relacionou juntamente com as fases de desenvolvimento do biofilme anteriormente a interferência genética no processo de formação do biofilme durante uma escala de tempo (Figura 2.4). Essa visão tornou mais contemporânea o modo de entender o desenvolvimento do biofilme.

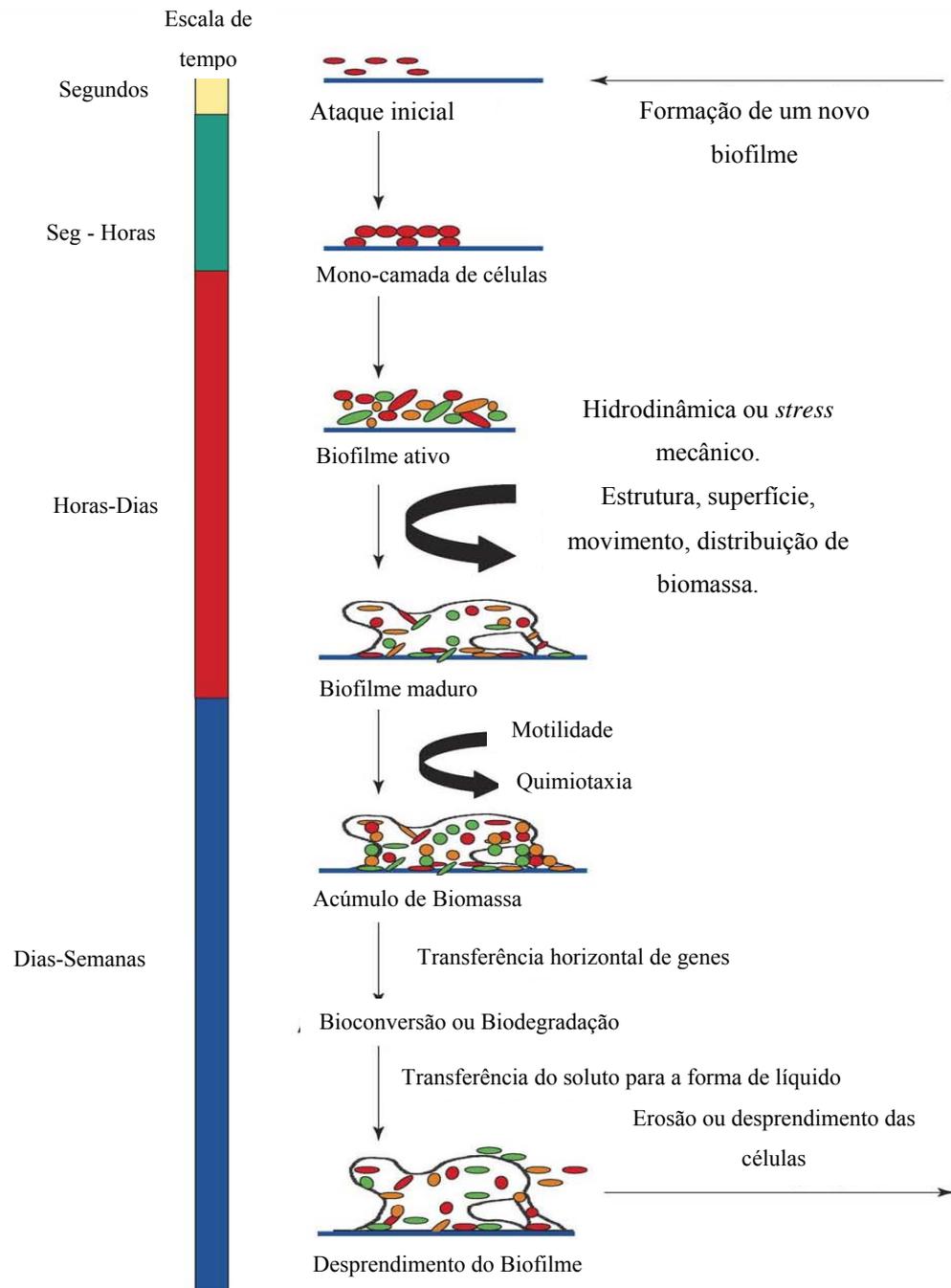


Figura 2.4: Modelo de desenvolvimento de biofilme enfocando a influência genética. Adaptado de Singh *et al.* (2006).

2.1.3 – Principais características e fatores que influenciam o desenvolvimento do biofilme

Existem algumas características relevantes que incrementam a discussão a respeito da definição de biofilme. A quantidade de microrganismos, por exemplo, é fator determinante para uma aglomeração microbiana ser considerada como biofilme. Alguns autores consideram como biofilme uma associação com, no mínimo, 10^7 células aderidas por cm^2 (Andrade, 1998; Pereira, 2001). Contudo, o que caracteriza fundamentalmente um biofilme é a presença do EPS.

Outra característica relevante do biofilme é a capacidade de adesão física das células microbianas. Esse fator é fundamental para a integridade da estrutura do biofilme. Estudos realizados enfocam a grande importância da adesão para a permanência e manutenção do biofilme com fator de resistência a ação dos biocidas. De acordo com Dunne (2002) existem dois tipos de forças de adesão envolvidas no processo de formação do biofilme: a primeira ocorre quando há a adesão dos microrganismos ao substrato e ainda é reversível. Já a segunda força, caracteriza-se pela produção do EPS, é irreversível e não há interferência de forças químicas e físicas.

A adesão das células microbianas, aliada ao crescimento, reprodução e adesão das células suspensas no fluido ao biofilme, representam processos que contribuem para o aumento do crescimento do biofilme. Um fator que afeta diretamente a adesão é a característica do substrato, sendo fator limitante para o desenvolvimento do biofilme. Aliado a característica do substrato, existem uma série de outros fatores que influenciam diretamente o desenvolvimento do biofilme. Para uma melhor compreensão da interferência destes fatores, a descrição de cada um será organizada didaticamente como segue:

- a) tipo e características do substrato;
- b) características do meio aquoso;
- c) hidrodinâmica do fluido;
- d) propriedades das células;
- e) características genéticas (regulação genética);
- f) força iônica do meio;
- g) a concentração e a qualidade de nutrientes no meio circundante;
- h) presenças de micro nutrientes (magnésio, sódio, potássio, cálcio, etc);

- i) presença de material particulado;
- j) presenças de agentes antimicrobianos.

Diante da abrangência de cada fator de interferência será abordada breve referência dos mais relevantes citados pela ampla literatura, enfocando sua importância em relação ao estudo realizado.

2.1.3.1 - Tipo e Características do Substrato

A natureza e as características do substrato são fatores relevantes para iniciar o processo de formação do biofilme. A discussão sobre essa influência já é abordada desde 1984, quando Characklis observou que a extensão da colonização microbiana parece aumentar com o aumento da rugosidade da superfície. Esse fato é explicado devido à superfície do biofilme aumentar a interação com a superfície rugosa do substrato. Contudo, as características do substrato influenciam diretamente esse processo inicial, além de influenciar a razão e extensão do ataque microbiano.

A natureza eletroquímica do substrato também é relevante para o ataque microbiano. Superfícies com característica mais hidrofóbica e não polar são mais rapidamente e preferencialmente atacadas, como é o caso do Teflon. Contudo, a falta de equipamentos adequados parece causar certa discussão a respeito de como quantificar especificamente o tamanho da superfície hidrofóbica do substrato e o seu respectivo contato com o biofilme, provocando dúvidas sobre a influência da natureza eletroquímica do substrato.

2.1.3.2 – Características do meio

Fatores como natureza do meio aquoso, temperatura, pH, presença de nutrientes e íons livres mostram-se inteiramente relevantes para o desenvolvimento do biofilme. As características da água influenciam no possível tipo de biofilme formado, contribuindo positivamente ou de forma negativa no número de microrganismos presentes (Almeida, 2002).

Já temperaturas entre 30°C e 50°C, e pH neutro favorecem o crescimento de microrganismos, principalmente bactérias. A interferência da temperatura está exatamente na alteração da razão de reações das enzimas, pois como toda proteína as enzimas possuem temperaturas ideais para o seu perfeito funcionamento. Caso contrário, em temperaturas extremas, por exemplo, as enzimas desnaturariam-se (Olofsson, 2003). Valores de pH abaixo ou muito acima da neutralidade afetam diretamente o desenvolvimento do biofilme por interferir na força próton motora, que é a força utilizada pela bactéria para gerar o seu gradiente eletroquímico. Essa alteração acarreta imediatamente em um efeito biocida para as bactérias (Pereira, 2001).

O aumento da concentração de alguns íons como: íons férricos, cálcio e sódio, demonstraram interferir no ataque de *Pseudomonas fluorescens* a superfície de vidro, reduzindo as forças repulsivas entre a carga negativa das células e da superfície do substrato (Donlan, 2002). Já em relação a influência da concentração de nutrientes, verificou-se que quando se aumenta a concentração de nutrientes livres no meio, proporcionalmente há o respectivo aumento no número de microrganismos presentes no biofilme formado, além desse fator ser determinante para a adsorção da camada de moléculas presente no biofilme que antecede a adsorção de bactérias (Rubio, 2006).

2.1.3.3- Hidrodinâmica do fluido

O fluido que fica em contato com a interface biofilme/substrato apresenta características hidrodinâmicas que afetam diretamente o desenvolvimento e a estabilidade do biofilme. Essas características hidrodinâmicas são a velocidade e a turbulência da corrente líquida. Essas características interferem no processo de adesão entre as células, quantidade de nutrientes no meio circundante e desprendimento dos microrganismos.

A velocidade do fluxo possui dois lados relevantes: interfere na taxa de transferência de massa do seio do líquido para o biofilme, bem como no seu desprendimento. Neste primeiro caso, se a velocidade do fluxo for baixa, o processo de transferência de massa do líquido para o biofilme será insuficiente para a formação consistente da estrutura coesa do biofilme formado. Entretanto, caso a velocidade do fluxo seja excessiva irá haver uma

formação mais coesa e mais compacta do biofilme, apesar de haver um maior desprendimento (Characklis, 1984).

Em bioreatores, a hidrodinâmica do fluido é considerada como fator fundamental que influencia a formação, estrutura e estabilidade do biofilme. Alta taxa de hidrodinâmica no fluido resulta em uma estrutura forte do biofilme, quando formado, além de uma composição heterogênea (Yu Liu, 2002). A hidrodinâmica do fluido também influencia o ataque dos microrganismos ao substrato e seu processo de mobilização.

2.1.3.4 – Propriedades das células

Apesar de serem considerados como organismos aparentemente “simples”, os microrganismos apresentam características altamente complexas e intrigantes que os favorecem em diferentes ambientes e nas suas diversas formas de vida. Características peculiares da composição química da membrana celular e da parede celular de bactérias, como a presença de moléculas hidrofóbicas e/ou hidrofílicas, são pontos que favorecem a adesão ao substrato, como também uma maior interação entre células para a constituição do biofilme.

A influência das propriedades das células microbianas, principalmente em bactérias, está intrinsicamente relacionada ao ataque inicial ao substrato. Características como: hidrofobicidade das células, presença de fímbrias e flagelo, e formação de EPS influenciam a razão e extensão do ataque dos microrganismos ao substrato. Todas estas características levam em consideração a forte influência da sua constituição bioquímica que interage com a superfície. Por exemplo, homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos são moléculas que conferem estabilidade mecânica, adesão, coesão e resistência ao biofilme no substrato (Duan, 2008).

Outra característica relevante é a presença do flagelo, que confere às bactérias a capacidade de atacar mais rapidamente o substrato mesmo com o fluxo de corrente em alta velocidade. Merecem destaque também a presença de cílios e pseudópodes, que contribuem significativamente para a fixação e movimentação ao longo da superfície, além do canal de transferência genética denominado de “*pilin*” que permite a variabilidade genética e adesão entre as células (Yu Liu, 2002).

2.1.3.5 – Características genéticas (regulação genética)

A composição genética dos microrganismos é considerada como fator chave de influência no processo de formação do biofilme, pois determina diferentes tipos de características e comportamentos. Características como a capacidade de ataque ao substrato, adesão das células, formação, desenvolvimento, heterogeneidades na composição, maturação, resistência a biocidas e ao ataque de predadores, são todas favorecidas pelo resultado da grande variabilidade genética (O’toole, 2000).

A presença em bactérias dos denominados genes silenciosos repercute na aquisição de uma resistência, manifestada tanto fisiologicamente como morfológicamente. Outro fator que também é responsável por conferir resistência a esses microrganismos é a transferência horizontal de genes entre bactérias, pois gera uma nova recombinação genética. Como resultado da aquisição da resistência, os microrganismos nos biofilmes conseguem aumentar a constituição do EPS, e a sua produção de metabólicos secundários, que interfere no aumento da taxa de corrosão (Chapman, 1998).

A expressão de genes pode também mudar como resultado do modo de vida dos microrganismos: planctônico ou sésil (Garrett,2008). A produção de genes que favorece a produção de apêndices de superfície que ajudam na locomoção como flagelo e fimbrinas, é inibida em espécies sésseis, pois não há necessidade de existir tais estruturas. Por outro lado, genes que conferem produção de proteínas de superfície e produtos de excreção aumentam significativamente a sua expressão em organismos sésseis, devido aumentar a produção da matriz polimérica extracelular que confere maior adesão entre as células e a superfície.

A habilidade da bactéria e de outros tipos de microrganismos de comunicar e coordenar seu comportamento através de sinais moleculares, denominada de “*quorum sensing*”, também afeta inteiramente o desenvolvimento do biofilme. Os sinais moleculares provocam vários tipos de “reações” de acordo com o estado e ambiente em que o biofilme esteja. Quando submetido à ação de biocidas ou *stress* ambiental, por exemplo, a sinalização molecular repercute em uma maior expressão de genes que confere maior produção de EPS, já que esse protege da penetração do biocida ou da desidratação provocada pelo ambiente (Beech e Gaylard, 1999).

2.1.3.6 – Concentração eletrolítica e forças físico-químicas

Fatores como concentração eletrolítica, forças iônicas e demais características do meio, são fortes influentes para o desenvolvimento do biofilme.

Um conjunto de forças físico-químicas do meio e força biológicas fazem contribuições significativas para a formação do biofilme. No processo inicial de adesão estão envolvidas forças hidrodinâmicas, gravitacional, difusional, termodinâmicas e até mesmo forças resultantes da mobilidade celular. No processo de interação com a superfície, os microrganismos precisam vencer algumas forças físicas ambientais, como: forças de Van der Waals, hidrofobicidade, forças hidrodinâmicas e de atração oposta. Por fim, mais outros tipos de forças influenciam: forças químicas, como ligação de hidrogênio, dipolo, tripolo e interpartículas (Yu Liu, 2002). Todas estas forças são vencidas ou interagidas quando ocorre a formação do biofilme.

Em relação a influência de nutrientes no meio, alguns autores defendem que a concentração eletrolítica de nutrientes afeta mais intensamente a adesão entre as células que o próprio condicionamento do filme na formação do biofilme, e que concentrações de carbono orgânico total (CCT) aumenta o fornecimento de substrato ou origem carbônica e, conseqüentemente, agem também interferindo no seu desenvolvimento (Little & Lee, 2007).

Várias evidências mostram que quando há baixa concentração de nutrientes o biofilme forma diferentes aglomerados ou espaços de células em que a água pode passar. Já quando há alta concentração de nutrientes, o biofilme se desenvolve mais compacto e firme. A concentração de nutriente limitada acaba resultando em um aumento significativo da morte celular (lise celular) e na produção de enzimas proteolíticas. Outros nutrientes como o nitrogênio e fósforo limitam o crescimento do biofilme em alguns sistemas aquáticos.

2.1.3.7 – Presença de material particulado

A presença de material particulado como grãos de areia ou caulino afetam o desenvolvimento do biofilme em dois aspectos apostos: pode favorecer seu desenvolvimento ou atuar com um verdadeiro “agente biocida”, desprendendo e destruindo a sua constituição.

A interferência no biofilme vai depender da natureza do tipo de material particulado, bem como o tipo de microrganismo envolvido. Grãos de areia atuam como agentes erosivos no desprendimento do biofilme, interferindo na sua estabilidade. Contudo, grãos de caulino provocam um efeito benéfico ao biofilme. Eles podem agir como reservatórios de nutrientes ou modificar a estrutura do biofilme de modo a permitir mais distribuição de nutrientes (Pereira, 2001).

2.1.3.8– Presença de agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos ou biocidas interferem significativamente no desenvolvimento do biofilme, pois possuem atividade contra a estrutura e o metabolismo celular dos microrganismos. Suas características, suas classificações, mecanismos de ação e suas interferências ao ambiente, serão vistos posteriormente.

2.1.4 – Importância dos biofilmes

A forma de desenvolvimento dos microrganismos como biofilme é ampla e extremamente espetacular. Esse modo de desenvolvimento representa uma forma de adaptação às condições ambientais, onde a comunidade microbiana se beneficia entre si e por isso pode ser encontrada nos mais diferentes ambientes. Devido apresentar ampla distribuição, os biofilmes acabam que apresentando propriedades extremamente prejudiciais ao homem como também, por outro lado, benéficas e/ou neutras.

As propriedades benéficas são conhecidas a tempo pelo homem. A produção de vinagre, por exemplo, provavelmente é a mais antiga atividade desenvolvida por biofilme já relatada (Pereira, 2001). Essa produção ocorre a partir de bactérias que produzem ácido acético ao se agregarem em fragmentos de madeira e converterem diversos substratos em vinagre.

Na era contemporânea, o uso de biofilme em biotecnologia tem se expandido muito, principalmente como agentes bioremediadores na descontaminação de solos e ambientes aquáticos. Segundo Macêdo (2000), biofilmes microbianos submersos podem ser usados no

processo de tratamento de água potável na remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e percussores de trihalometanos – substâncias muito tóxicas para seres humanos.

Vários outros tipos de poluentes químicos podem ser eliminados pela utilização da bioremediação por biofilmes. Substâncias químicas como 2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, pireno, fenantreno, n-alcanos, tolueno e alguns herbicidas foram bem remediados do ambiente pela utilização de diferentes métodos e microrganismos, chegando a aproximadamente cerca de 100% de degradação (Kargi, 2005). Metais pesados como Zinco (Zn), Cádmio (Cd) e Níquel (Ni) foram também remediados utilizando biorreatores com microrganismos anaeróbicos (Chang *et al.*, 2003).

O uso de biofilme no processo de remediação ambiental justifica-se principalmente por estes apresentarem uma alta taxa de biomassa e habilidade para imobilizar compostos poluentes por três mecanismos: bioadsorção, que é a sequestração passiva por interações com a matéria biológica; bioacumulação, processo de alta acumulação dos compostos químicos pelos microrganismos, e através da biomineralização, definida como a formação de precipitados insolúveis pela interação com os produtos metabólicos dos microrganismos (Singh *et al.*, 2006).

Duas outras interessantes e curiosas propriedades benéficas dos biofilmes são atualmente estudadas: a sua utilização na interação benéfica com plantas e a inibição da corrosão a partir do uso dos próprios biofilmes (Ramey *et al.* 2004; Mansfeld, 2007). A interação de biofilme com plantas pode ocorrer tanto naturalmente quanto induzida nas mais diferentes partes da planta: folha, raiz, caule, sementes ou esporos. O ponto positivo nessa interação consiste no mutualismo entre a planta e os microrganismos presentes no biofilme, onde ocorre a troca de nutrientes entre outros benefícios.

Em relação à inibição da corrosão através do uso de biofilme, pesquisas desenvolvidas por instituições de ensino superior que tem avaliado o controle da corrosão usando biofilmes regenerados em diferentes tipos de materiais, tanto em laboratório como em campo. Esse mecanismo de inibição da corrosão só ocorre na presença apenas de biofilme como forma de vida adotada pelos microrganismos e que essa taxa de inibição aumenta com o passar de semanas. Contudo, ainda há dúvidas em relação à inibição da corrosão pelo uso de biofilme.

Apesar de apresentarem utilização benéfica, os biofilmes são mais amplamente conhecidos pela sua ação negativa em vários setores das indústrias, como também por causar

sérios problemas de ordem médica, como a cárie por exemplo. Neste contexto negativo surge a definição pelas indústrias de “sujamento biológico” ou “*biofouling*”.

O *biofouling* pode ser definido como uma acumulação indesejável de depósito de natureza biológica sobre a superfície. Este depósito pode ter micro (*microfouling*) ou macrorganismos (*macrofouling*) e é um processo resultante da acumulação de biofilmes. A natureza do *biofouling* varia não apenas em relação ao tipo de microrganismo envolvido, mas também devido às características das substâncias abióticas. Com isso, são quatro os tipos de *fouling* que pode ocorrer: *fouling* biológico, *fouling* químico, *fouling* de corrosão e *fouling* de partículas. A presença de *biofouling* pode ocorrer tanto em fluxos turbulentos como em águas paradas, sobre diversos tipos de superfícies, metálicas ou não, lisas ou em fissuras (*crevices*) (Videla, 2003).

O *biofouling* gera sérios problemas. Na indústria de alimentos causa grandes prejuízos de ordem econômica e sanitária. A primeira evidência na literatura de contaminação de alimentos por biofilmes foi feita por Zoltai *et al.* (1981), onde descreveu o contato dos microrganismos com a superfície inerte dos alimentos. Atualmente, sabe-se que a contaminação de alimentos por biofilmes pode veicular microrganismos patogênicos e provocar contaminação crônica, o que afeta diretamente à saúde dos seres humanos. Neste tipo de contaminação podem estar envolvidos fungos e bactérias.

Na indústria de papel os biofilmes são responsáveis por danificar a qualidade do papel, produzir fortes odores indesejáveis e por provocarem a corrosão de alguns tipos de materiais. Já em relação à indústria aeronáutica, portuária e naval, o principal transtorno econômico é a biocorrosão. De acordo com Videla (2003), nos tanques integrais de aviões a jato a biocorrosão afeta a aviação comercial e militar desde o uso do combustível tipo JP (*jet propulsion*), que são biodegradados por fungos e bactérias presentes nos tanques de armazenamento de combustíveis. As indústrias naval e portuária são vulneráveis à biocorrosão marinha, sendo afetados os cascos de embarcações, motores marítimos e tanques.

Nos últimos anos vem crescendo a preocupação com casos de infecções patogênicas geradas por biofilmes na área médica. Biofilmes bacterianos, por exemplo, provocam em humanos vários tipos de infecções, como: osteomielites, pneumonias, fibrose cística e problemas com a válvula endocárdica e a própria cárie dental. Os biofilmes também podem se desenvolver dentro de catéteres urinários e permitir a hidrólise da uréia em amônia livre, o que gera a formação de incrustações por compostos químicos resultantes deste processo e que

acabam bloqueando o lúmen do catéter e trazendo consequências graves para o paciente (Donlan, 2002).

As infecções geradas por biofilmes também ocorrem em animais. Doenças como pneumonia, abscessos, enterites e diversos tipos de infecções têm sido relatados por ser desencadeadas por biofilme, gerando sérios problemas em diferentes tipos de animais. As infecções podem ser causadas por microrganismos presente no ambiente, como *Pseudomonas aeruginosa*, ou pelos microrganismos que fazem parte da própria micro flora do animal (Clutterbuck *et al.*, 2007).

Na indústria petrolífera a biocorrosão gerada por biofilmes é o foco dos danos econômicos, representando cerca de 20% do total dos casos de corrosão. Estes 20% representam aproximadamente 60 bilhões de dólares por ano, ou 0,84% do PIB. Estes custos podem estar relacionados à parada das instalações para substituição de estruturas corroídas ou para limpeza, manutenção e substituição dos elementos filtrantes ou de medição, remoção de depósitos biológicos em sistema de armazenamento, tubulações, entre outros (Videla, 2003).

As atividades da indústria de petróleo mais frequentemente afetadas por ação corrosiva de microrganismos associados a depósitos biológicos são: a extração do petróleo, processamento, distribuição e armazenamento. Além da indústria de petróleo a indústria de gás também sofre fortes danos devido à biocorrosão.

2.2 - Corrosão Microbiológica

Para compreendermos a complexidade do processo de corrosão microbiológica é necessário inicialmente entendermos, de um modo geral, o que é corrosão, suas diferentes formas e quais são as alterações provocadas em diversos materiais usados nos diferentes setores industriais, principalmente na indústria petrolífera.

2.2.1– Corrosão

2.2.1.1 – Definição

O conceito de corrosão é bastante difundido e abrangente na literatura, pois acaba englobando várias definições de acordo com seus tipos específicos e a natureza do material

presente. Pode ser definido, em termos gerais, como o ataque produzido sobre um metal por um meio agressivo com conseqüente deterioração do substrato. É um processo eletroquímico natural causado por um fluxo de elétrons de um metal para outro ou para qualquer outro metal com deficiência de elétrons. Como conseqüência, os metais passam de seu estado elementar para uma forma combinada, ou seja, tendem a retornar à forma de óxido, com exceção dos metais nobres (Videla, 2003). A partir da passagem para este estado elementar suas qualidades essenciais, como resistência mecânica, elasticidade e ductibilidade são perdidas, sendo o produto da corrosão formado extremamente pobre em termos destas propriedades.

Contudo, para que ocorra a corrosão é necessário um meio líquido condutor do fluxo de íons (o eletrólito), como por exemplo, a água do mar ou diversos tipos de águas industriais. O envolvimento da água no processo de corrosão dá-se por ser um dos fluidos mais comuns de transferência térmica e que a presença de gases dissolvidos (como oxigênio, dióxido de carbono, amônia, cloro), íons dissolvidos (cloretos, magnésio, sulfato, bicarbonato) e sólidos suspensos tornam a água mais agressiva que a água pura (Souza, 2007).

A reação de corrosão transcorre sobre o metal em duas regiões: anódica e catódica. As reações anódicas e catódicas devem acontecer a velocidades equivalentes, sendo a dissolução do metal ocorrendo sobre o ânodo e o acúmulo sobre o cátodo, que deve ser evitado por meio do consumo. Este consumo pode ocorrer por uma destas duas reações: redução de oxigênio em pH neutro e solução aerada (Equação 1) ou redução de prótons em meio ácido e desaerado (Equação 2).



Outras reações alternativas de consumo de elétrons podem ocorrer, como o consumo através do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que contribuem com outros reagentes catódicos, como o hidrogênio sulfetado ou bissulfetos, como veremos no eletroquímica da biocorrosão.

Alguns fatores contribuem para o desenvolvimento da corrosão. Os principais fatores característicos são: o meio e a natureza do material utilizado (Gentil, 1996). O meio pode ser

a atmosfera, águas naturais, solos, produtos químicos e, em menor escala, substâncias fundidas e solventes orgânicos. Dando destaque a influência da corrosão em águas naturais, os materiais metálicos em contato com a água tendem a sofrer corrosão em decorrência de agregados metálicos, que se formam pela ação de íons metálicos sob a influência de moléculas de água, bem como pela presença de alguns contaminantes, como gases e sais dissolvidos, matéria orgânica de origem vegetal e animal, e também microrganismos como bactérias.

2.2.1.2 – Corrosão localizada

A corrosão pode ser classificada em formas bastante variadas. De acordo com Videla (2003) a corrosão pode ser dividida em dois grandes grupos: corrosão uniforme e corrosão localizada. A corrosão uniforme não possui muita relevância tendo em vista o controle da sua velocidade. Por outro lado, a corrosão localizada constitui um fator preocupante.

A corrosão localizada é formada quando os sítios sobre o metal, onde ocorrem as reações anódica e catódica, se separam permanentemente, o que acaba gerando uma maior dissolução do metal. Pode ser induzida sobre a superfície metálica por depósitos bióticos ou abióticos que originam uma célula de aeração diferencial ou de concentração de oxigênio. Em uma célula desse tipo, a área sob o depósito (área menos oxigenada) atuará como ânodo, enquanto a área descoberta atuará como cátodo. Esse tipo de corrosão pode ser subdividida em alguns subtipos, tais como: corrosão por *pites*, frestas, crevice, *cracking*, entre outros.

A corrosão localizada por *pites* merece especial atenção por ser bastante comum nos setores industriais e por ser a forma mais frequente de corrosão em que os microrganismos estão envolvidos. Associado a este subtipo de corrosão localizada é indispensável enfatizar alguns termos para entendermos as alterações provocadas pela ação microbiana, que será vista posteriormente neste capítulo.

O potencial de *pites* (E_p) é um dos termos referente a um valor-limite de potencial anódico abaixo do qual o metal permanece passivo, porém acima deste começa um aumento marcante de corrente, que indica o início e a progressão dos *pites*. Este potencial pode ser útil para testar o comportamento de um metal ou liga metálica diante da biocorrosão. Outro termo

significativo para avaliar a interferência dos microrganismos e caracterizar a corrosão localizada por *pites* é o potencial de repassivação (E_r), que representa o potencial abaixo do qual não se formam novos *pites* sobre a superfície metálica.

2.2.2 – Corrosão Induzida Microbiologicamente

2.2.2.1 – Definição e Histórico

Os microrganismos são indiscutivelmente formas extraordinárias de vida. Suas características peculiares, como o rápido crescimento e a capacidade de resistir as mais diversas condições ambientais, os tornam organismos altamente adaptáveis. Entretanto, estas características atribuem um caráter negativo e preocupante para os mais diversos setores industriais, pois são critérios que favorecem a corrosão microbiológica.

A corrosão microbiológica ou biocorrosão é definida de uma maneira geral como um processo eletroquímico de dissolução metálica facilitado, iniciado e/ou acelerado por microrganismos e pelos produtos da sua atividade metabólica (Miranda *et al.*, 2006; Da Silva e Pontes Filho, 2008). Romero *et al.* (2005) acaba resumindo a corrosão microbiológica como um sistema formado pela interação de três componentes: metal, solução e microrganismos, e que esse processo só pode ser iniciado pela presença de uma fonte de energia, de carbono, um elétron doador e um receptor, e a presença da água. Dessa forma, os microrganismos acabam agindo sobre a extensão e a resistência do material, seja pela sua interação direta na forma de biofilme e/ou como resultado da ação dos seus produtos metabólicos.

A participação dos microrganismos em diferentes tipos de corrosão de diferentes materiais já não é um fato recente. Entretanto, o avanço considerável na pesquisa em biocorrosão deu-se apenas nos últimos 30 anos. Os trabalhos desenvolvidos para evidenciar e explicar a corrosão microbiológica se fundamentaram concretamente só a partir de meados da década de 1960. Contudo, houve uma exceção em especial feita por um trabalho pioneiro de von Wolzogen Kuhr e van der Flugt em 1934, que foi considerado o primeiro trabalho a interpretar a corrosão microbiológica eletroquimicamente.

No início dos anos 60 as pesquisas nessa área voltavam-se mais para estudos sobre o envolvimento de bactérias na corrosão de ferro e outras estruturas (Starkey, 1958). Durante o fim dos anos 60 e início da década de 70 as pesquisas em biocorrosão passaram a objetivar o envolvimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS) no processo de corrosão anaeróbica para justificar a sua participação na teoria da polarização catódica. Neste mesmo período, alguns trabalhos foram publicados introduzindo o uso de técnicas eletroquímicas, como o experimentos de polarização, potencial de corrosão *versus* tempo, além de equipamentos para observação do efeito das BRS sobre a corrosão do ferro. Através dos resultados obtidos a partir dessas pesquisas foi possível confirmar a atividade catódica das BRS (Videla e Herrera, 2005).

A partir da década de 80 as pesquisas em biocorrosão avançaram consideravelmente, principalmente pelo interesse crescente dos diversos setores industriais e pela unificação do conhecimento intelectual das mais diferentes áreas de pesquisas, como a microbiologia aliada à eletroquímica e a ciência de materiais, entre outras. Nesta mesma época, grande encontros ocorreram com objetivo de entender as complexas interações entre a interfase biológica, a superfície do material e o meio.

A biocorrosão passou a ser definida cientificamente como *Microbiologically Influenced Corrosion* (MIC), em português Corrosão Influenciada (ou induzida) Microbiologicamente (CIM). No fim dos anos 90 e início do novo século passou-se a aplicar novas técnicas ao estudo da biocorrosão. Surgiram tecnologias mais sofisticadas, como o uso a microscopia de força atômica (AFM), a microscopia eletrônica de varredura (MEV), técnicas de análise de dispersão por Raios-X (ADRX) e difração de Raios-X (DRX). A análise de microprobe em estudos e investigações, o uso de microsensores de análise química em biofilme e as avançadas técnicas da biologia molecular, também contribuíram para as pesquisas em biocorrosão (Videla & Herrera, 2005). Desde então, os estudos nesta área avançaram consideravelmente.

2.2.2.2 – Tipos de microrganismos

Vários são os microrganismos envolvidos na biocorrosão. Esse envolvimento é correlacionado à formação do biofilme que permite a interação entre os diversos tipos de

microrganismos, como bactérias aeróbicas e anaeróbicas, além de fungos, alguns tipos de algas e protozoários.

A formação e o desenvolvimento do biofilme é o ponto crítico para iniciar, manter e/ou acelerar o mecanismo de corrosão. Este fato pode ser justificado principalmente pela produção do EPS, que atua modificando as características eletroquímicas da superfície do metal, e pela ação intensa do maior grupo de microrganismos presente: as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Beech, 2004; Antony *et al.*, 2008).

Em conjunto ou não com as bactérias redutoras de sulfato (BRS), outros tipos de microrganismos em biofilme podem provocar a biocorrosão, principalmente na forma de *pite*. Os principais grupos classificados de acordo com o seu metabolismo que estão presentes tanto em ambientes marinhos como terrestres são: bactérias redutoras de ferro, bactérias CO₂ redutoras, bactérias oxidantes de sulfato, de ferro e manganês; e bactérias produtoras de ácidos orgânicos e de exopolímeros (Beech e Gaylard, 1999; Beech, 2004).

2.2.2.2.1 – Bactérias aeróbicas

As bactérias com metabolismo aeróbico são consideradas as primeiras a formarem o biofilme propriamente dito, como visto anteriormente no seu processo de formação. Podem ser aeróbicas totais ou apenas tolerantes ao oxigênio, e são as responsáveis pelo fornecimento de condições ideais para bactérias anaeróbicas, por consumir todo o oxigênio ao longo do tempo. As espécies mais conhecidas por provocarem corrosão são: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia*, entre outras. Podem ser Gram positivas como também Gram negativas (Pereira, 2001).

As bactérias aeróbicas acabam gerando a corrosão por produzir grande quantidade de material extracelular (EPS), ácidos orgânicos, e outras substâncias, que acabam interagindo com o metal. Contudo, há poucas informações a respeito do mecanismo específico de corrosão.

Incluídos nesse grupo estão subgrupos com metabolismos específicos, como: bactérias oxidantes de enxofre, precipitadoras de ferro, entre outros.

2.2.2.2 – Bactérias precipitadoras de Ferro

As bactérias precipitadoras de ferro são pertencentes a um grupo amplo e diversificado que possuem como metabolismo basal a oxidação do ferro a férrico, constituindo-se assim um conjunto de microrganismos potencialmente capazes de provocar e/ou acelerar a corrosão.

São caracteristicamente difíceis de serem isoladas e cultivadas em laboratório, sendo amplamente encontradas em água de rios, lagos e de produção de petróleo. Possuem na sua grande maioria uma bainha locomotora e sua presença pode ser detectada pela grande acumulação de precipitado férrico como produto da corrosão. Essa acumulação pode causar entupimentos na indústria de petróleo, além dessas bactérias possibilitarem a redução da permeabilidade do solo (Videla, 2003).

Dentre as espécies mais conhecidas envolvidas com a biocorrosão podemos citar os gêneros: *Gallionella*, *Siderophacus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Crenothrix* e *Clonothrix*. Todos os gêneros possuem espécies com características morfológicas e metabólicas diferenciadas. Por exemplo, a espécie *Gallionella ferruginea* tem metabolismo autotrófico, necessita de baixas concentrações de oxigênio e é difícil de se isolar em laboratório, em oposição à *Sphaerotilus natans*, fácil de ser isolada em laboratório e que necessita de boa quantidade de oxigênio.

O mecanismo de corrosão desencadeado pelas bactérias precipitadoras de ferro apresentado por Videla (2003) resume-se na produção de ferro férrico pela seguinte Equação 3:



O ferro produzido (Fe^{3+}) acaba se acumulando e formando tubérculos de hidróxido de ferro, o que pode gerar uma formação de célula de aeração diferencial.

2.2.2.2.3 - Bactérias Anaeróbicas

Existem vários tipos de microrganismos com metabolismo anaeróbico que estão presentes em biofilme, contudo não são os primeiros a favorecerem à corrosão. Como anteriormente citado, as bactérias aeróbicas são essenciais para posterior colonização das bactérias anaeróbicas no biofilme, já que é necessário todo o consumo do oxigênio presente por parte das bactérias aeróbicas.

As bactérias anaeróbicas abrangem vários tipos de espécies, sendo as bactérias redutoras de sulfato as mais conhecidas por provocar a corrosão. Os outros tipos de bactérias anaeróbicas, apesar da pouca discussão na literatura a respeito, são conhecidas por influenciar o processo de corrosão e também produzir ácidos orgânicos como produto do seu metabolismo. Esses ácidos agem diretamente na despolarização do metal e/ou servem de subprodutos para o metabolismos de outros microrganismos como as BRS.

2.2.2.2.4 - Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo considerado taxonomicamente variado de bactérias, relacionadas por aspectos fisiológicos e ecológicos. Foram reconhecidas como produtoras de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S) e como principais responsáveis do processo de biocorrosão.

As BRS possuem uma considerável distribuição no ambiente. Podem ser encontradas em sedimentos marinhos, límnicos, solos, águas anóxicas, no conteúdo intestinal de animais e em biofilmes. No mar, podem ser encontradas a mais de 70 metros de profundidade. São heterotróficas, anaeróbicas estritas, crescem em uma faixa ótima de temperatura entre 25 e 44°C e pH entre 5,5 e 9,0, além de sobreviverem em ambientes com incidência de altas pressões atmosféricas e também altas temperaturas. Algumas espécies, como *Desulfotomaculum*, podem viver em temperaturas superiores a 55°C, sendo frequentemente encontradas em águas de injeção na indústria extrativa de petróleo (Jack, 2002).

Apresentam-se morfologicamente como bacilos curvos, às vezes espiralados, com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e 3,0 a 5,0 μm de comprimento, além de possuir um flagelo polar para movimentação (Castro, 2000). As BRS são divididas em dois grupos fisiológicos

distintos: espécies que oxidam substratos orgânicos incompletamente a acetato e espécies que oxidam completamente substratos orgânicos, incluindo acetato, a dióxido de carbono (CO₂).

No ciclo do enxofre as BRS são capazes de reduzir o íon sulfato por duas vias metabólicas diferentes: o sulfato é utilizado como fonte de enxofre, sendo reduzido a sulfetos orgânicos por redução assimiladora de sulfatos; e na respiração anaeróbica o sulfato atua como receptor terminal de elétrons, que produz hidrogênio sulfetado, segundo a redução desassimiladora de sulfatos (Figura 2.5).

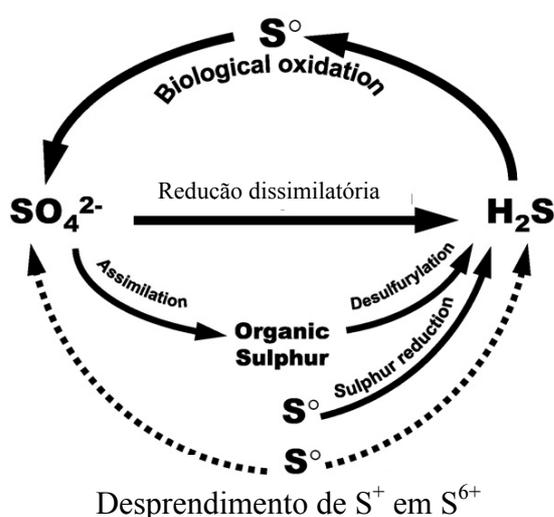


Figura 2.5: Ciclo biológico do enxofre evidenciando os processos de oxidação e redução. Adaptado de Tang *et al.*, 2009.

Algumas características peculiares são usadas para classificar as bactérias redutoras de sulfato diante da sua grande variedade. Postgate (1984) divide as BRS em dois gêneros conhecidos: *Desulfovibrio* e *Dessulfotomaculum*. O primeiro é caracterizado por ser mais fácil de isolar e cultivar, todas as espécies desse gênero são mesófilas e podem existir espécies halófitas, mas nenhuma espécie forma esporos. Já o gênero *Dessulfotomaculum* é caracterizado por produzir esporos, serem mesófilos e termófilos.

Já para Castro *et al.* (2000) as características mais usadas para classificação são: a forma de movimentação, a motilidade, a relação das bases nitrogenadas Guanina (G) e Citosina (C) na cadeia de DNA, a presença de desulfovirium e citocromo, temperatura ótima e

a completa *versus* incompleta oxidação do acetato. Dentro da análise genética, especificamente através da análise de RNA ribossomal (r-RNA), as BRS são classificadas em quatro diferentes grupos: BRS mesófilas Gram-negativa, BRS Gram-positiva produtoras de esporos, bactérias BRS termófilas e BRS arqueal termófilas. Todos estes grupos são caracterizados por utilizar o sulfato como aceptor final de elétrons durante o processo de respiração anaeróbica.

As bactérias redutoras de sulfato estão envolvidas em cerca de 95% dos casos de biocorrosão (Mehanna *et al.*,2008). O envolvimento das BRS no processo de biocorrosão é explicado principalmente pela Teoria da Despolarização Catódica (TDC). Essa teoria foi formulada por von Wolzgen Kuhr e Van der Vlugt em 1934, sendo considerada como a primeira interpretação eletroquímica de um caso de biocorrosão mencionado na literatura.

Segundo a TDC, o processo de biocorrosão é acelerado catodicamente pelo consumo enzimático do hidrogênio mediante a capacidade hidrogenásica das BRS. Essa despolarização catódica se viabiliza pela remoção do hidrogênio adsorvido na superfície metálica, que polariza ou detém o processo desfavorecendo a recombinação de átomos de hidrogênio na zona catódica. O hidrogênio catódico formado na superfície do metal produzido na corrosão ou pela proteção catódica acaba promovendo o crescimento dos microrganismos, principalmente das BRS que utilizam o hidrogênio no seu metabolismo (Figura 2.6).

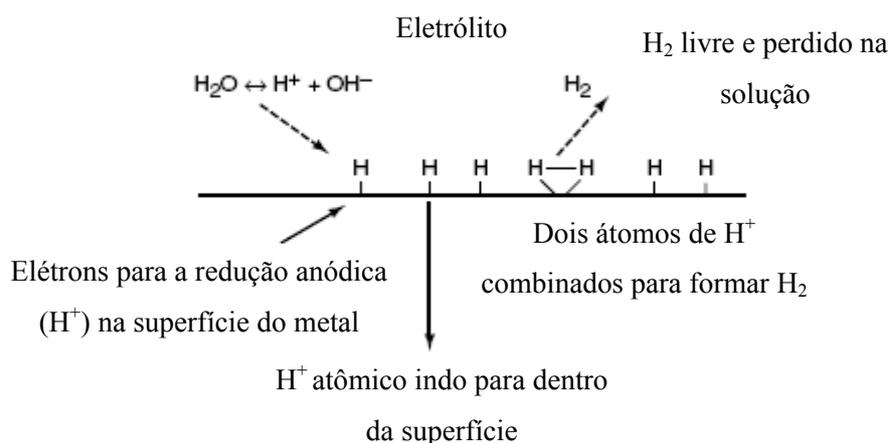


Figura 2.6: Diagrama esquemático de uma superfície catódica em um processo de corrosão anaeróbica, no qual o H⁺ é reduzido para H sobre a superfície do metal. Adaptado de Jack, 2002.

Os elétrons ganhos neste processo promovem a redução do íon sulfato a íon sulfeto, o qual é agressivo ao metal. Outros produtos além do sulfeto podem ser produzidos, como bissulfetos, hidrogênio sulfetado, e produtos metabólicos intermediários, como tiosulfatos e politionatos. Todos acabam possuindo relevância no processo de corrosão anaeróbica do ferro e do aço, pois estes produtos acabam tornando o pH mais ácido, entre outras reações.

O papel das BRS estaria limitado à remoção dos átomos de hidrogênio adsorvidos sobre o sulfeto ferroso, enquanto este atuaria como verdadeiro agente despolarizador da produção de hidrogênio, sugerindo que o efeito despolarizador se deve ao hidrogênio sulfetado e não a ação da enzima hidrogenase, como descreve a teoria da despolarização catódica. Alguns trabalhos enfocam esta evidência e mostram que as BRS são metabolicamente favoráveis a reduzir não apenas o sulfato, mas também podem utilizar outras substâncias comoceptor terminal de elétrons. Entre as principais substâncias que pode ser utilizadas destaca-se o tiosulfato (Penna *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2006).

De acordo com Sheng *et al.* (2007) a presença de bactérias aeróbicas pode ser necessária por desempenharem duas importantes funções que propicia o ambiente ideal para a atuação das BRS. A primeira função estaria no consumo de todo o oxigênio por ação das bactérias aeróbicas que proporciona o ambiente anaeróbico, permitindo o desenvolvimento das BRS. A outra função é atuar como produtoras dos ácidos orgânicos (APB) que servem como fonte de nutrientes para as BRS e aceleram o processo de corrosão por favorecer a produção de HCl ou outros metais como o FeCl₃, que favorecem a diminuição do potencial de repassivação do metal. A baixa do potencial de repassivação do metal aumenta a susceptibilidade do material à corrosão por *pite*.

A grande preocupação dos danos causados por BRS na indústria de petróleo não se resume apenas à produção de sulfeto, como se acreditava na época da descoberta da participação das BRS no processo de corrosão, mas devem-se também a algumas habilidades desempenhadas por estes microrganismos. Estas habilidades são: a oxidação do hidrogênio, a utilização do ferro (Fe⁺⁺) no seu metabolismo, a capacidade de utilizar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, a possibilidade de conectar a redução do sulfato a produção intracelular de magnetita, a tolerância de competir com outros tipos de bactérias com metabolismos diferentes e a produção de ácido sulfídrico (Miranda *et al.*, 2006).

Dando destaque à interferência do ácido sulfídrico, seu principal problema está associado ao aumento excessivo na sua produção em reservatórios de petróleo, denominada de *souring*, que acaba gerando graves problemas. Os principais problemas ocasionados seriam: aumento na deposição de sulfeto de ferro, plugueamento de poços injetores e produtores levando a redução da produtividade dos poços, redução da qualidade dos hidrocarbonetos produzidos, problemas de saúde, segurança e meio ambiente; e principalmente aumento de corrosões de tubulações e facilidades de produção devido ao aumento da corrosividade dos fluidos produzidos (Penna *et al.*, 2003).

A taxa de corrosão provocada por ação das BRS acaba sendo bem representativa quando se analisa e compara a taxa de corrosão anual. Estima-se que essa taxa chega a 0.2 mm/ano no geral e alcança 0.7 mm/ano em relação à corrosão provocada especificamente por *pites*, isso representa mais de 75% da corrosão produzida na indústria de petróleo (Miranda *et al.* 2006). Contudo, esses valores podem variar de acordo com a natureza do material envolvido e também depende da concentração de sulfeto de ferro (FeS).

2.2.2.2.5 – Fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes com metabolismos heterotróficos, que crescem preferencialmente a 30° C, tolerando ambientes com baixa umidade, menor taxa de nitrogênio e pHs mais ácidos, condições opostas para o crescimento bacteriano (Magot, 2000). Apesar de apresentar características totalmente diferenciada das bactérias e estarem habitualmente em ambientes opostos, os fungos podem estar em associação com bactérias e algas em biofilme, desempenhando papel importante sobre a corrosão.

Uma das espécies mais comumente encontrada provocando corrosão isolado ou em associação com bactérias é o fungo *Harmoconis resinae*, que está presente em combustíveis de aviação, como o JP. A temperatura ótima de crescimento desse fungo fica em 30° C e provoca corrosão por produzir ácidos orgânicos que baixam o pH (Videla, 2003).

Outros gêneros de fungos são frequentemente encontrados associados com a corrosão, entre os mais encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichosporon* se destacam.

2.2.2.3. – Eletroquímica da Biocorrosão

Os microrganismos modificam a interfase metal/solução para induzir, acelerar e/ou inibir o processo anódico ou catódico que controla a reação de corrosão. Neste caso, com a formação do biofilme há a formação de uma célula de aeração diferencial, que separa as regiões anódicas e catódica, e provoca a corrosão, sendo mantida pelo consumo do oxigênio pelos microrganismos.

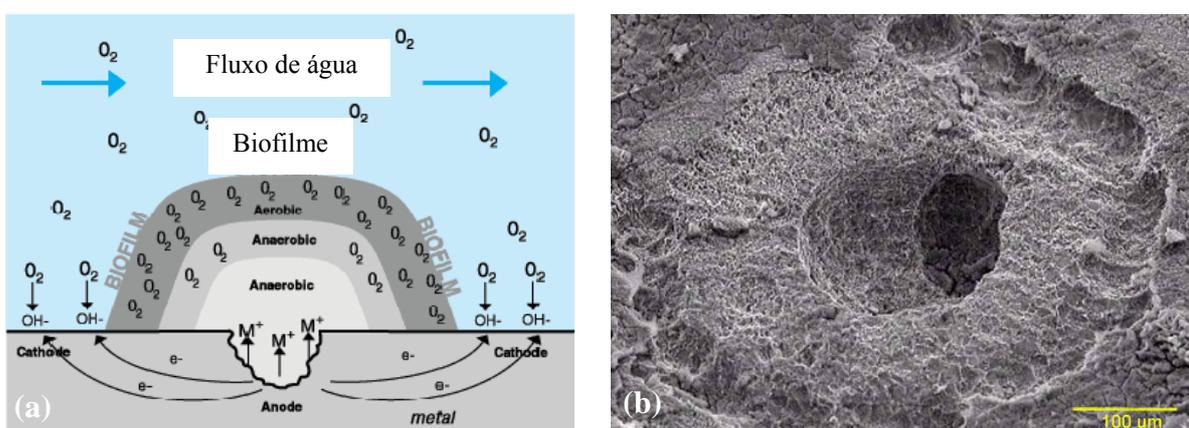


Figura 2.7: Eletroquímica da biocorrosão: a) célula de aeração diferencial formada pelo acúmulo de microrganismos em biofilme e b) micrografia de um *pite* provocado por microrganismos. Adaptado de Castro (2000).

Na Figura 2.7 observa-se a origem de uma região anaeróbica sob a colônia, devido ao consumo de oxigênio pela respiração microbiana, e outra região, mais oxigenada na parte externa da colônia em contato com o meio líquido aerado. A única diferença da reação catódica em relação ao caso inorgânico é que os microrganismos induzem e mantêm o gradiente de concentração de oxigênio por um processo biológico, que é a respiração. Esse gradiente de concentração de oxigênio acelera ativamente a reação de corrosão por via catódica enquanto a respiração estiver ativa. Neste tipo de célula de aeração diferencial há como consequência a produção do *pite*.

Os microrganismos na forma de biofilme sobre a superfície metálica são capazes de induzir importantes mudanças no tipo e na concentração de íons, pH, níveis de oxigênio,

velocidade de fluxo de líquidos e a capacidade tampão do meio nas proximidades do metal. Uma interpretação bioeletroquímica foi feita por Javaherdashti (2006) para interpretar a ação do conjunto de diferentes tipos de microrganismos presentes em biofilme provocando a corrosão por *pite*, como mostra a Figura 2.8.

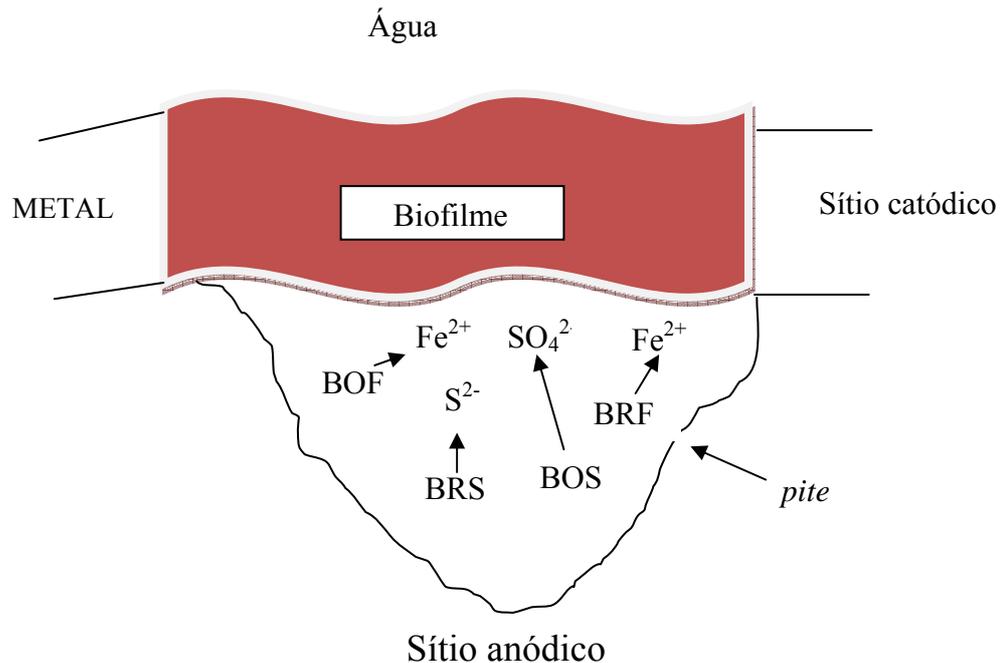


Figura 2.8: Diagrama esquemático do possível processo que pode ocorrer durante a formação do *pite* pela atividade biológica dos microrganismos, onde BOF são bactérias oxidantes de ferro; BRS: bactérias redutoras de sulfato; BOS: bactérias oxidantes de sulfato e BRF: bactérias redutoras de ferro. Adaptado de Javaherdashti (2006).

Este esquema mostra como as bactérias podem agir para induzir anódicos e catódicos sítios dentro do *pite*. As bactérias atuam iniciando a corrosão localizada dentro da superfície do tubérculo, progredindo como resultado da concentração de produtos resultante dos seus diferentes metabolismos e pelo declínio do valor de pH gerado na base do *pite*. O único ponto em falta de tal esquema seria a pouca possibilidade desses tipos de bactérias estarem todas juntas no mesmo local.

De maneira geral, os microrganismos podem interferir de dois modos eletroquimicamente diferentes, são os chamados efeitos anódicos e efeitos catódicos de ação biótica. Videla (2003) cita esses diferentes efeitos que podem transcorrer de forma simultânea ou consecutiva, de forma sinérgica ou se contrapondo, sendo difícil de ocorrerem isolados. São eles:

- Efeitos anódicos:

- Produção de metabólitos corrosivos, como a produção de ácidos orgânicos produzidos por fungos como o *Hormoconis resiniae*;

- produção de metabólitos que incrementam a corrosividade de outros íons presentes no meio, como os sulfetos produzidos por BRS que potencializam a indução de *pites* devido a cloretos presentes na água do mar;

- consumo de inibidores de corrosão pelo metabolismo microbiano, como o consumo fúngico de nitratos para fonte de nitrogênio.

- Efeitos catódicos:

- produção de reagentes catódicos, como hidrogênio sulfetado pela redução de sulfatos pelas BRS, ou prótons, resultantes da produção de metabólitos ácidos;

- indução da formação de células de aeração diferencial pelo consumo de oxigênio na respiração das bactérias aeróbicas, por exemplo;

- despolarização da reação catódica pelo efeito da hidrogenase das BRS pela Teoria da Despolarização Catódica (TDC).

2.2.2.4 – Detecção e monitoramento da biocorrosão

A detecção e monitoramento da biocorrosão são formas de prevenção e de controle desse tipo de corrosão. O aumento dos prejuízos causados nos diversos setores industriais, principalmente na indústria de petróleo, acabou proporcionando maiores investimentos na forma de como monitorar e entender a ação dos microrganismos envolvidos neste processo.

A detecção e o monitoramento focava-se, inicialmente, na população de células planctônicas presentes na água industrial e pelo gerenciamento da corrosão generalizada pelo uso de cupons ou por algum tipo de amostra com resitência ou com polarização resistente. Contudo, apesar de atualmente ser necessária a sua realização, dois motivos acabaram gerando bastante questionamento sobre o uso dessas técnicas. Um dos pontos referia-se que a população planctônica não reflete o tipo e o número de microrganismos vivendo em biofilmes e causando problemas de biodeteriorização. O outro ponto enfatizava as diferentes formas de ação dos agentes antimicrobianos em microrganismos vivendo na forma planctônica e em forma de biofilmes, que acabam sendo mais resistentes pela ação do EPS (Videla e Herrera, 2005).

Com isso, o monitoramento passou a ser não apenas voltado às técnicas de amostragem e acompanhamento dos microrganismos, mas também a ser aliado na compreensão de como eles agem diretamente *in situ* sobre o material através de metodologias microbiológicas e eletroquímicas de observação em tempo real (Surman *et al.*, 1996).

Várias técnicas foram desenvolvidas e são muito usadas atualmente para a análise da biocorrosão. Elas constituem a análise microbiológica, que inclui: métodos de amostragem de microrganismos séseis e planctônicos, métodos microscópicos de detecção, que inclui vários equipamentos principalmente o uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV), e o uso de técnicas da biologia molecular, como DGGE e PCR. Todas essas técnicas serão brevemente descritas a seguir, já que são de fundamental importância para o entendimento deste trabalho.

2.2.2.4.1 – Métodos de amostragem de microrganismos

Os métodos de amostragem refletem a quantidade de microrganismos presentes e a forma de como estes possam estar interagindo no ambiente. Guiamet *et al* (1999) classifica em dois métodos: amostragem de microrganismos planctônicos e amostragem de microrganismos séseis. Contudo, a amostragem de organismos planctônicos atualmente passou a ser menos utilizada principalmente por apresentar algumas desvantagens, como o fato de não representar o número de microrganismos presentes na forma de biofilme e por estes tipos de microrganismos não serem os principais responsáveis do processo de biocorrosão.

Por outro lado, a amostragem de microrganismos sésseis surge como foco central de pesquisas por apresentar várias vantagens, que seriam: os microrganismos em biofilme representam mais propriamente a população microbiana do sistema em termos de números ou biomassa, as espécies de microrganismos são diferentes das formas de vida planctônica e podem apresentar diferentes atividades metabólicas, e por fim a susceptibilidade à ação dos biocidas é menor devido a presença da matriz polimérica extracelular ou EPS (Videla, 2001).

Para a realização desse tipo de amostragem alguns tipos de monitoramento podem ser feitos em lugares distintos, desde que se possam obter amostras de boa qualidade e significativas. Essas amostras podem ser obtidas a partir do local real (*in situ*), como diretamente do sistema industrial, ou simulando as condições reais feitas em laboratório (*ex-situ*).

O método *in situ*, feito rotineiramente em torres de refrigeração, passou a ser mais facilitado em termos técnicos e difundido com o surgimento de dispositivos mais modernos para o estudo da biocorrosão, como sondas eletroquímicas. Já o método *ex-situ* pode ser utilizado para estudar os possíveis efeitos da modificação de diferentes variáveis de operação, desenho, ambientais ou tratamento com biocidas, sendo viável o acompanhamento da biocorrosão de uma forma mais próxima. Contudo, a eficácia do método de amostragem é obtido aliando-se os dois métodos, ou seja, as amostras obtidas a partir da indústria podem ser posteriormente analisadas em laboratório vendo o lado microbiológico e as características eletroquímicas, como atualmente é feita (Xu *et al.*, 2008).

Um dos métodos de amostragem *ex-situ* mais atualmente usados é *loop*, um sistema dinâmico que reproduz o fluxo de água em tubulação por auxílio de uma bomba, com vazão de água constante e que permite a colocação e a consequente retirada de cupons para a formação e análise de biofilme. Esse sistema dinâmico tem o propósito de simular bem as condições de campo, sendo utilizado para avaliação de biocidas, acompanhamento do desenvolvimento de biofilmes e avaliar os processos corrosivos bióticos e abióticos (Penna *et al.*, 2002). O *loop* pode ter tamanhos variados e geralmente é feito de PVC e de acordo com o propósito do pesquisador.

Diversas estratégias de monitoramento de biocorrosão em águas de injeção na indústria petrolífera são realizadas utilizando sistemas dinâmicos baseadas em análises químicas, microbiológicas e eletroquímicas que seguem mais ou menos certo roteiro, iniciado pela contagem de bactérias sésseis, seguida de observação de biofilme por MEV, análise

química de produtos de corrosão e biofilmes, observação do ataque corrosivo por MEV e finalizado por medições eletroquímicas de corrosão.

2.2.2.4.2 – Métodos microscópicos de detecção

Aliado ao método de amostragem *ex-situ* faz-se necessário o acompanhamento mais aprimorado e minucioso das amostras a partir dos métodos microscópicos de detecção. Esses métodos estão cada vez mais aprimorados e diversificados com o propósito de analisar da melhor forma a estrutura e interação nos biofilmes.

Dentre os diversos métodos microscópicos utilizados no estudo da biocorrosão, os mais relevantes e mais ultimamente utilizados são: a espectrofotometria de absorção atômica (EAA), microscopia de força atômica (MFA), espectrofotometria de massa (EM), difração de Raios-X (DRX), microscopia de epifluorescência (ME) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Beech et al., 2005), que será detalhada a seguir por ser propósito neste estudo.

2.2.2.4.2.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que se fundamenta no uso de um feixe estreito de elétrons de alta energia sob um ponto da amostra para gerar imagens. É utilizada para observação de amostras espessas que oferece um alto poder de resolução e uma grande profundidade do foco, garantindo a obtenção de imagens com aparência tridimensional (Segantini e Dantas, 1996).

Nos últimos anos essa técnica tem adquirido considerável atenção no estudo de biocorrosão sendo um dos métodos mais comumente usado para examinar biofilmes originados a partir da água do mar devido possuir boa qualidade do foco de visualização e por produzir imagens nítidas dos microrganismos sobre o substrato mesmo sendo opaco. Esse método tem sido especificamente usado para observar o EPS, a morfologia da bactéria e da colônia aderida sobre a superfície do material, a morfologia da superfície do material e a relacionamento entre eles (Beech, 2004).

A partir do uso da microscopia eletrônica de varredura pode-se fazer o acompanhamento da estrutura física do biofilme e da própria estrutura do material antes e

após o contato com algum tipo de biocida avaliado, sendo possível analisar o grau das alterações ou estado da corrosão e a efetividade do produto. Contudo, apesar de imensamente importante e cheio de vantagens, anteriormente citadas, o uso da microscopia eletrônica de varredura ainda apresenta algumas desvantagens que acabam influenciando o seu uso no estudo da biocorrosão. Uma das mais fortes seria a grande mão de obra e cuidados requeridos na produção das amostras, pois são necessários vários tipos de reagentes, na maioria de custo elevado, para se obter uma boa qualidade das micrografias. Outro ponto desfavorável é o alto custo do equipamento e a exigência de mão de obra especializada.

2.2.2.4.3 – Monitoramento através de técnicas da biologia molecular

Apesar de imensamente utilizadas às técnicas de cultivo de microrganismos acabam apresentando alguns pontos considerados desfavoráveis do ponto de vista prático do estudo da biocorrosão. A obtenção de resultados só após um longo período (aproximadamente 30 dias) e a capacidade de cultivar apenas 10% dos microrganismos presentes em um sistema natural através de seus métodos convencionais (Borgne *et al.*, 2007) torna necessário o uso de novas técnicas que a complementem.

O monitoramento da biocorrosão a partir de métodos da biologia molecular vem crescendo consideravelmente nos últimos anos por envolver análise rápida e direta de toda a população microbiana a partir do seu material genético, sem ser necessário o cultivo dos microrganismos. Borgne *et al.* (2007) elenca algumas vantagens do uso da biologia molecular no monitoramento da corrosão microbiológica em relação ao uso das técnicas convencionais de cultivo. São elas: a identificação de bactérias dominantes presentes em ambientes industriais sem o uso de técnicas de cultivo, determinação da proporção de contribuição de uma bactéria específica na corrosão dentro de toda a população bacteriana, identificação das bactérias vulneráveis e resistentes a biocidas e evidencia a mudança na população bacteriana devido o uso de biocidas ou mudança na composição do fluido.

Dentre as técnicas da biologia molecular mais comentadas usadas, o uso da extração de DNA acompanhada por reação em cadeia de polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) e a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) destacam-se no estudo da biocorrosão (Green, 2005).

A técnica de PCR é uma das etapas usadas para a identificação de biofilmes microbianos em seu ambiente natural e consiste na amplificação de parte do DNA através de ciclos de desnaturação, alinhamento e polimerização (Figura 2.9).

Para que ocorra a amplificação de DNA a técnica de PCR utiliza-se de enzima polimerase juntamente com nucleotídeos e alguns íons importante, como magnésio, em uma mesma solução. A enzima polimerase tem função de unir os nucleotídeos para formar uma nova molécula de DNA a partir de um molde e íons como o magnésio atuam como co-fatores enzimáticos. A formação do DNA é favorecida pela alteração de temperatura dentro do ciclo que permite a distensão do DNA inicial com elevadas temperaturas e consequente ligação da enzima polimerase, e a sua junção a partir de baixas temperaturas, formando novas moléculas de DNA.

Após a amplificação, as moléculas de DNA produtos são separadas e analisadas usando sequências de DNA em eletroforese, que as separa pela diferença de cargas eletroquímicas. As vantagens apresentadas da PCR são a pouca quantidade de material genético requerido, obtenção de ótimos resultados de forma rápida, a grande quantidade de DNA amplificado em pouco tempo e a possibilidade de acoplamento direto com outras técnicas mais modernas, como a espectrofotometria de massa e DGGE (Denkhaus *et al.*, 2006).

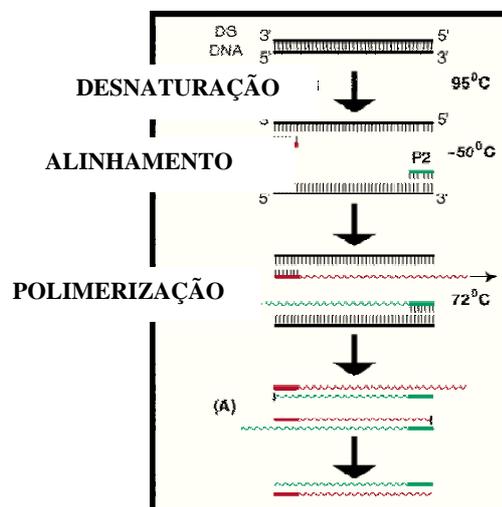


Figura 2.9: Esquema de PCR mostrando os ciclos de desnaturação do DNA, alinhamento e polimerização a partir de *primers* (P2) em diferentes estados de temperatura, resultando na produção de novas moléculas de DNA (A). Adaptado de www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif. Março de 2009.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) é um dos métodos da Biologia molecular mais poderoso que pode rapidamente identificar a real caracterização da diversidade, composição, estrutura e ecologia de uma comunidade microbiana em biofilme.

As análises em DGGE fundamentam-se na separação da dupla fita de fragmentos de DNA de igual tamanho, mas com sequências diferentes, através do uso de gradiente de DNA desnaturante. Seu mecanismo baseia-se na diferença de estabilidade entre o pareamento das bases nitrogenadas Guanina e Citosina (GC), que apresentam três ligações de hidrogênio, em oposição à Adenina e Timina (AT), que possui apenas duas ligações de hidrogênio. Em geral, fragmentos de DNA ricos em guanina e citosina são mais estabilizados e permanecem mais tempo no gel até atingir altas concentrações de desnaturação. Com isso, há uma separação pelo tamanho da dupla fita de DNA que se desnatura e permite a recombinação com outros *primers* já selecionados para a separação, possibilitando assim a identificação dos microrganismos em questão (Green, 2005).

A aplicação destes métodos moleculares no estudo da corrosão microbiológica vem sendo utilizado cada vez com mais para a identificação e caracterização da população microbiana em diferentes ambientes, como: solo, águas do mar e de produção industrial, de sedimentos, lodo granular anaeróbico, entre outros; e acabam sendo sempre empregados para a identificação espacial e temporal da distribuição microbiana devido à imensa viabilidade e praticidade (Teng *et al.*, 2008).

Vários trabalhos mostram a importância do uso de DGGE e PCR na identificação e caracterização de microrganismos, principalmente quando utilizadas para a avaliação da comunidade microbiana presente na água de produção industrial e após o uso de biocidas (George *et al.*, 2008). A população microbiana, segundo Borgne *et al.* (2007), pode alterar-se ou não após a utilização de biocidas, sendo que pode surgir o aparecimento de novas espécies e que os métodos convencionais de cultivo podem dar um falso resultado sobre a avaliação microbiológica em águas industriais, por isso torna-se necessário as técnicas moleculares para complementá-las.

2.2.2.5– Métodos de controle da biocorrosão

A biocorrosão atinge diferentes setores industriais, principalmente a área petroquímica e petrolífera, em seus diversos sistemas, como: circuitos de resfriamento, tanques de armazenamento, tubulações de usos diversos, membrana de osmose reversa, linhas de injeção de água, entre outros. Para controlar a biocorrosão é preciso a elaboração de um programa efetivo de limpeza e sanitização, o que em outras palavras seria a denominada “regra de ouro” para a prevenção e controle da biocorrosão. Entretanto, elementos como a má elaboração de estratégias de limpeza, monitoramento ineficiente dos sistemas e falta de profissionais especializados na área de corrosão microbiológica, proporcionam o aumento de prejuízos decorrentes da corrosão.

De acordo com a literatura os métodos mais usados para prevenção e controle da biocorrosão são os métodos físicos e químicos (Kumar & Anand, 1998; Videla, 2003). Os métodos físicos incluem a limpeza mecânica, e os métodos químicos enquadram-se os biocidas. A utilização desses métodos tem o propósito de diminuir ou erradicar a exposição do metal à ação da biocorrosão, seja através da eliminação direta dos microrganismos ou redução do efeito dos seus metabólitos sobre o material.

A limpeza mecânica compreende qualquer método capaz de promover a remoção física do material depositado na superfície e inclui o uso de escovação, esferas de limpeza, jatos d’água, entre outros. Por outro lado a limpeza química resume-se no uso de substâncias químicas diversas, sendo utilizada após a limpeza mecânica. Segundo Videla (2003) a limpeza química é mais eficiente em ambientes fechados e zonas de ataque localizado. Contudo, dentre os métodos de controle efetivamente mais usados habitualmente as substâncias químicas denominadas de biocidas se destacam.

2.2.2.5.1 – Biocidas

Substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas voltadas para a eliminação ou redução de microrganismos em sistemas industriais são denominadas de biocidas. Estes podem ser formados por uma única substância ou por combinação de mais de uma.

Na indústria de petróleo essas substâncias são amplamente utilizadas na proteção interna de oleodutos, gasodutos, na área de refino, na injeção de água, nas recuperações secundárias, nos fluidos de perfuração e na produção propriamente dita de petróleo para controle de microrganismos planctônicos e principalmente para geradores de biofilmes, possuindo de forma geral atividade bactericida, fungicida e algicida (Mainier e Silva, 2004). Contudo, alguns biocidas podem não possuir atividade para determinados tipos de microrganismos dentro de um mesmo grupo, mas podem ter para outros.

2.2.2.5.1.1- Classificação

Os biocidas podem ser classificados, de modo geral, segundo a sua forma de ação em: metabólicos, surfactantes, não-oxidantes e oxidantes (Souza, 2007). Os biocidas metabólicos atuam dentro da célula interferindo no metabolismo dos microrganismos. Os mais comuns são os carbamatos, isotiazolonase e sulfonas. Os surfactantes, diferentemente dos metabólicos, atuam fora da célula microbiana a partir da ruptura da membrana celular por apresentar caráter hidrofóbico e afinidade com a natureza lipídica da membrana, sendo os mais comuns os compostos de aminas quaternárias.

Já os biocidas não-oxidantes apresentam certa vantagem em relação aos demais por possuir ação específica para determinados tipos de microrganismos, agindo diretamente sob as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e ferrobactérias. Os glutaraldeídos são tipos de biocida não-oxidantes mais comumente usado pela indústria. Por outro lado, os biocidas oxidantes agem em qualquer matéria oxidável, como células biológicas e biomassa, com o cloro e bromo sendo os mais usados nessa categoria. Estas substâncias agem através de reações químicas com a membrana celular, protoplasma e com as enzimas.

Videla (2002) classifica os biocidas mais especificamente em oxidantes e não-oxidantes. Os biocidas oxidantes apresentam algumas desvantagens: podem interagir com outros componentes químicos do sistema e possuem potencial para provocar corrosão, sendo os não-oxidantes mais eficientes. Contudo, seria ideal a combinação dos dois tipos para a aplicação em campo devido a potencialização das ações.

2.2.2.5.1.2 – Mecanismos de ação dos biocidas

A plena efetividade da ação dos biocidas é diretamente relacionada com a sua composição química, concentração, tempo de exposição e, principalmente, pela forma que essas substâncias agem sobre os mais variados tipos de microrganismos: fungos, vírus, bactérias; além de algas e protozoários. A forma de ação baseia-se na interação inicial do biocida com a parte “alvo” do microrganismo a partir da afinidade com suas propriedades químicas, resultando em processos que comprometem ou destroem a célula bacteriana.

A forma de ação dos biocidas baseia-se na interação com outros componentes celulares para produzir mudanças na hidrofobicidade e destruição da membrana celular, causando dissipação da força próton motora que envolve a ação de transporte, fosforilação oxidativa e síntese de ATP na bactéria, sendo a atividade enzimática também afetada. Outros pontos de ação são a inibição da atividade metabólica da célula microbiana interferindo diretamente na síntese de ácidos nucleicos e na acumulação de radicais livres (Myers, 2008).

Videla (2003) dividem a ação dos biocidas sobre os microrganismos em três grupos distintos: biocida com atividade sobre a membrana, agentes eletroquimicamente ativos e ingredientes ativos que formam competidores. O primeiro grupo age da mesma forma como citado anteriormente por Myers (2008), contudo os agentes eletroquimicamente ativos reagem com os componentes nucleófilos presente nas estrutura microbiana tornando eletrofílico o grupo carbonila. O último mecanismo baseia-se na formação de compostos que competem com cátions necessários ao metabolismo celular.

A Tabela 2.1 caracteriza a parte “alvo” e o modo de ação de cada biocida especificamente.

Tabela 2.1: Alguns tipos de biocidas e seus respectivos mecanismos de ação sobre os diferentes “alvos” na célula microbiana. Adaptado de Myers, 2008.

Biocida	Mecanismo	“Alvo” do biocida na célula
Glutaraldeído	“Cross-linking”	Parede celular
Fenólicos, clorohexedina, compostos quaternários de amônia	Aumento da permeabilidade	Outra membrane (Gram negativa)
Compostos quaternários de amônia, clorohexedina, alcoóis, ácidos orgânicos	Aumento da permeabilidade	Membrana citoplasmática
ácidos orgânicos, fenólicos, compostos quaternários de amônia	Mudança do potencial da membrana	
Óxido de etileno, clorohexedina.	Síntese de ATP	
Clorohexedina, compostos quaternários de amônia, fenólicos.	Inibição da atividade enzimática	
Clorohexedina, glutaraldeído, compostos quaternários de amônia	Coagulação geral	Constituintes Citoplasmáticos
Formoldeído, glutaraldeído, ácidos orgânicos	Age na síntese de ácidos nucléicos	
Peróxido de hidrogênio, compostos orgânicos derivados do mercúrio.	Ribossomo	
Óxido de etileno, glutaraldeído, peróxido de hidrogênio, iodinos.	Grupos tiol	Interação com grupos específicos
Glutaraldeído, óxido de etileno.	Grupos Amino	
Glutaraldeído, óxido de etileno, sais metálicos.	Grupo sulfidril	
Peróxido de hidrogênio	Acumulação de radicais livres	Indução por atividade autocatalítica

2.2.2.5.1.3 – Fatores que interferem na ação do biocida

Alguns fatores interferem diretamente na efetividade plena do biocida, sendo os mais citados na literatura elencados abaixo de acordo com Videla (2003) e Myers (2008):

- características da superfície do metal (presença de poros ou irregularidades);
- tempo de contato no sistema industrial;
- concentração utilizada;

- presença de impurezas, de outras substâncias químicas e de matéria orgânica que podem interagir com o biocida e neutralizar a sua ação;
- capacidade do microrganismo de inativar o biocida;
- pH e temperatura;
- tipo, estado e composição física do microrganismo, pois formas de endosporos são mais resistentes à ação do agente químico.

2.2.3- Produtos naturais: possíveis métodos de controle

2.2.3.1 - O gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) possui aproximadamente 250 espécies, incluindo espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte, distribuindo-se na América do Sul e Central, além de territórios da África tropical. A distribuição desse gênero no Brasil ocorre principalmente na região Nordeste nos estados de Pernambuco, Paraíba, Ceará, Bahia e parte do Rio Grande do Norte, além de ocorrer em Goiás e na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (Terblanché e Kornelius, 1996; Pimenta *et al.*, 2007).

A denominação *Lippia* surgiu a partir do pesquisador August Lippi, um botânico italiano que descobriu este gênero. As plantas pertencentes a esse grupo são caracterizadas pela presença de compostos químicos conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana bastante efetiva (Lambert *et al.*, 2001; Kunle, 2003). Além da presença da atividade antimicrobiana, as plantas desse gênero também são usadas tradicionalmente na medicina alternativa para problemas gastrointestinais, respiratórios, cutâneos e algumas espécies possuem atividade antimalarial, sedativa, antiinflamatória, cicatrizante e citostática já comprovadas, sendo utilizadas diferentes partes sob forma de infusão ou decocção com uso oral (Pascual *et al.*, 2001).

A atividade antimicrobiana do gênero *Lippia* é bastante discutida e avaliada na literatura. Vários gêneros de bactérias, incluindo Gram-positivas e negativas, e fungos foram submetidos à avaliação, com completa ou parcial inibição. Espécies de bactérias comumente conhecidas como *Bacillus cereus* e *Salmonella sp.* foram totalmente inibidas pela ação das plantas *Lippia organoides* e *Lippia gracilis* (Cavalcanti, 2006; Albuquerque *et al.*, 2006).

Bactérias responsáveis por infecções respiratórias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* também foram inibidas por ação de *Lippia dulcis*. Do mesmo modo, outras espécies do gênero *Lippia* agiram sobre o crescimento de microrganismos como *E. coli* e *Mycobacterium smegmatis*. Contudo, a literatura revela atividade variando de baixa a média do óleo essencial desse gênero contra *Pseudomonas aeruginosa* (Lemos *et al.*, 1990; Pascual *et al.*, 2001).

Gêneros de fungos presentes naturalmente no ambiente, patogênicos e contaminantes de cultura de tecidos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, também foram avaliados e totalmente inibidos pela ação de plantas do gênero *Lippia* (Oliveira *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2005). Da mesma forma a ação antiviral já foi confirmada para algumas espécies (Pascual *et al.*, 2001).

O táxon genérico também inclui algumas espécies que possuem atividade aromática característica e na culinária o uso dessas plantas já passou a ser bastante comum com diferentes propósitos (Pascual *et al.*, 2001). O uso de espécies para reflorestamento de áreas degradadas pela extração de minério também é relatada (Guevara *et al.*, 2005). Contudo, apesar de inúmeras utilidades o gênero *Lippia* ainda é muito pouco pesquisado.

2.2.3.1.1 – A espécie *Lippia gracilis* Schauer

Lippia gracilis Schauer é um subarbusto pouco ramificado conhecido popularmente como “alecrim de chapada”, “alecrim de tabuleiro” ou simplesmente “alecrim”, sendo encontrado na região semi-árida do Nordeste brasileiro, principalmente no estado de Pernambuco e pequena parte do Rio Grande do Norte (Matos, 1999; Marreto *et al.*, 2008).

É uma espécie que cresce em terrenos bem drenados, alcançando de 1,2 a 2 m de altura, com flores amarelo-esbranquiçadas, frutos com sementes que raramente germinam e folhas pequenas e aromáticas ricas em óleos essenciais (Cavalcanti, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

O óleo essencial de *Lippia gracilis* é rico em substâncias químicas como o timol, carvacrol, *p*-cimeno e γ -terpineno, que conferem sua potente característica antimicrobiana. O óleo essencial também é usado externamente no tratamento de doenças de pele, inflamações, úlceras e até como agente larvicida no controle de espécies como o *Aedes aegypti* e

Callosobruchus maculatus (Pereira *et al.*, 2007; Marreto *et al.*, 2008). As atividades moluscida e antioxidante também são relatadas na literatura (Lima *et al.*, 2008).

Na lista de espécies elaboradas pela Central de Medicamentos (CEME) para o Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais (PPPM) do Ministério da Saúde encontra-se *Lippia gracilis* Schauer, sendo citada como uma das mais importantes (Pimenta *et al.*, 2007).

2.2.3.1.2 – O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer

Os óleos essenciais assim como cumarinas, flavanóides, taninos, entre outras substâncias, são produtos com atividade biológica denominados de metabólitos secundários. Estas substâncias são resultantes do metabolismo dos vegetais que os produzem sem necessariamente possuir quaisquer atividade vital para para seu metabolismo, mas que de alguma forma os ajuda a sobreviver. Podem ser sintetizados por todas as partes da planta e naturalmente são produzidos como estratégias de defesa contra a ação de vírus, bactérias, fungos e insetos, além de estimular a atração de agentes polinizadores, como insetos e pássaros, ou servir como repelentes para agentes herbívoros (Cavalcanti, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

De forma geral os óleos essenciais são caracterizados por serem voláteis naturais, formados em plantas aromáticas por complexas moléculas que os confere forte odor. O odor nas espécies desse gênero é caracterizado por ser extremamente agradável, dando destaque para o óleo essencial de *Lippia gracilis*. São substâncias geralmente líquidas, lipossolúveis e solúveis em compostos orgânicos apolares, apresentando baixa densidade em relação à água. São também conhecidos por suas propriedades antiséptica, antiviral, bactericida, fungicida e pelo seu uso na medicina popular para ação antimicrobiana, sedativa, antiinflamatória e anestésica (Bakkali *et al.*, 2008).

Existem várias formas de extração para óleos essenciais, como a destilação em solventes lipossolúveis e favorecidas por CO₂, além da prensagem. Contudo, é o processo de hidrodestilação o mais comum. Especificamente para o óleo de *L. gracilis* Schauer a extração é feita comumente por destilação úmida em aparelho Clevenger adaptado a um balão de vidro. O processo de destilação úmida baseia-se no aquecimento que permite a evaporação da água juntamente com o óleo que são posteriormente separados pela diferença de densidade.

Da mesma forma que o processo de extração, a época e o horário de coleta da planta, bem como o tipo de solo, clima, idade e estado de ciclo do vegetal são fatores que interferem na qualidade, quantidade e composição dos constituintes do óleo essencial. A quantificação dos compostos químicos geralmente é feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (CG-EM) (Angioni *et al.*, 2006).

A composição química dos óleos essenciais é caracterizada pela presença de dois a três constituintes em maior concentração que determinam as suas propriedades, sendo o restante da composição bem variada. Vários trabalhos revelam que o óleo essencial de *L. gracilis* Schauer é composto principalmente por constituintes químicos como o timol e cravacol, além de *p*-cimeno e γ -terpineno, anteriormente citados (Albuquerque *et al.*, 2006; Marreto *et al.*, 2008). Estes compostos são quimicamente classificados como terpenos e são conhecidos por conferirem a ação antimicrobiana (Reddy *et al.*, 1998; Albuquerque *et al.*, 2006). De acordo com Santos (2003) a maioria dos terpenos tem como precursor o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e os compostos formados são classificados de acordo com o número de moléculas de isopreno presentes. O terpenos mais comuns em óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos.

O terpeno timol é classificado na nomenclatura química como 5-metil-2-(1-etil) fenol ($C_{10}H_{14}O$) e é usado para tratamentos de infecções na boca, garganta e pele. É também encontrado em grandes concentrações em espécies do gênero *Thymus*, como na espécie *Thymus vulgaris*, conhecida popularmente como tomilho (Tebaldi, 2008). Já o carvacrol ($C_{10}H_{14}O$), quimicamente classificado como 2-metil-5-(1-metil-etil) fenol, é isômero de posição do timol, possuindo aroma forte e irritante com propriedades antimicrobiana e antiinflamatória (Cavalcanti, 2006). A Figura 2.10 ilustra esses terpenos evidenciando que a única diferença entre as moléculas é a posição do grupo hidroxila.

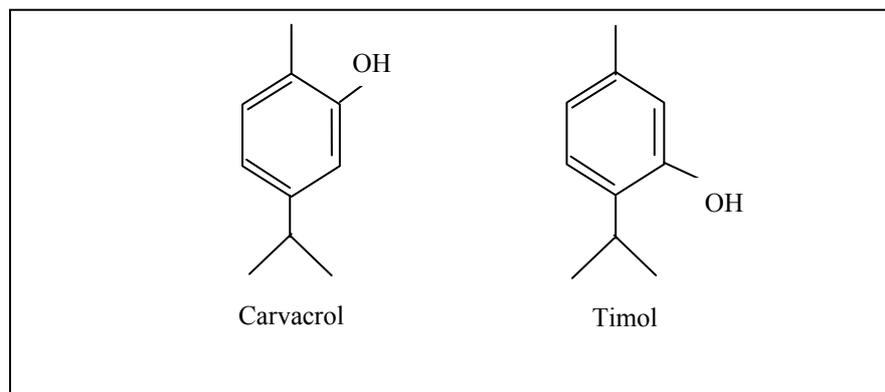


Figura 2.10: Moléculas dos terpenos carvacrol e timol.

Vários trabalhos evidenciam e comprovam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer. Alguns tipos de fungos como *Geotrichum candidum*, *Trichoderma viride*, *Fusicoccum sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium sp* e espécies de bactérias tais como *Bacillus pumilus*, *B. cereus* e *Enterobacter hormaechei* foram completamente inibidas pela a ação do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer em pequenas concentrações (Albuquerque *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Em outro trabalho a espécie *Mycobacterium tuberculosis*, conhecida por causar a tuberculose, também mostrou-se sensível à ação do óleo de *L. gracilis* comparado ao uso de drogas sintéticas (Cavalcanti, 2006).

As pesquisas revelam o potencial promissor do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer diante da sua forte ação antimicrobiana, sempre deixando em foco a importância de mais pesquisas e novas formas de se empregar o seu potencial nos mais diversos setores.

2.2.3.2 - O gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* compreende a tribo *Joannesieae* e pertence a família *Euphorbiaceae*, possuindo aproximadamente 170 espécies já conhecidas que se distribuem na África, Ásia, América Latina e principalmente em regiões de clima árido e semi-árido. O nome do gênero deriva do latim *jatrós* que significa “doutor” e *trophé* “comida”, implicando as suas propriedades medicinais (Heller, 1996).

As plantas desse gêneros possuem crescimento articulado com morfologia descontínua, podendo chegar de 8 a 10 metros de altura em condições favoráveis. Seu caule

contém grande quantidade de látex e o florescimento ocorre normalmente nas estações de verão e outono, permanecendo durante o ano todo quando as plantas estão submetidas permanentemente à regiões úmidas. As sementes de coloração preta amadurecem em torno de três a quatro meses depois do florescimento, sendo conhecidas pela produção de grande quantidade de óleo presente em seu álbumen, em torno de 60,8% (Silva, 2008; Kumar e Sharma, 2008).

2.2.3.2.1 – A espécie *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas é um arbusto ou pequena árvore leguminosa pertencente a família das *Euphorbiaceae*, a mesma da mamoma, que se distribui na América do Sul e Central, África, Índia e sudoeste da Ásia. No Brasil é conhecida popularmente como “pinhão manso” e encontrada praticamente em toda região Nordeste, sendo bem adaptada ao clima tropical (Openshaw, 2000).

É uma planta caracterizada pela sua grande resistência e adaptabilidade a climas áridos e semi-áridos, sobrevivendo sem exigências de grande quantidade de água e em solos pobres em nutrientes, podendo crescer de 5 a 7 metros e sobreviver até meio século. Suas folhas são macias, com quatro a seis lombos, atingindo de dez a 15 cm de diâmetro, que podem reduzir a superfície para evitar a perda de água em regiões com altas temperaturas. Possuem inflorescência terminal com flores unisexuais. Seus frutos são verdes quando jovens e amarelados quando maduro. Suas sementes são de cor pretas com cerca de 3 a 6 cm de comprimento, ricas em óleos e substâncias tóxicas (Figura 2.11) (Achten *et al.*, 2008).

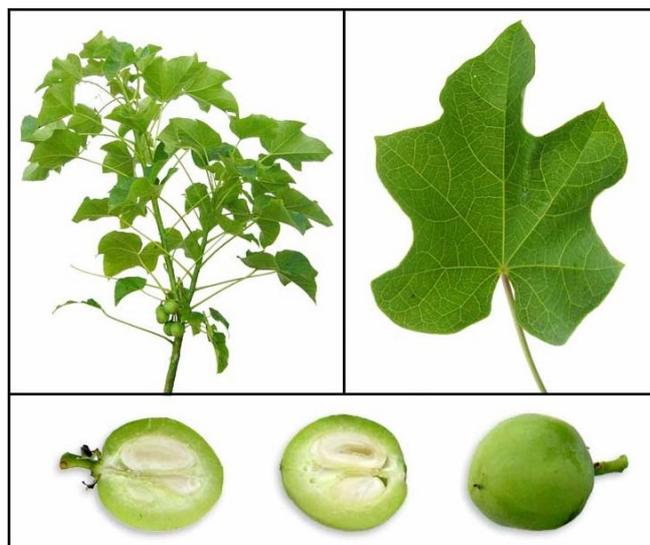


Figura 2.11: Imagens da planta inteira, da folha e das sementes de Pinhão manso (*Jatropha curcas*). Fonte: www.pinhaomanso.com.br.

A espécie *J. curcas* já é conhecida na medicina popular pelas suas variadas propriedades terapêuticas, podendo ser utilizadas todas as suas partes para diferentes propósitos. Propriedades biocida com ação sobre parasitas, insetos, moluscos e contra fungos são atribuídas ao composto tóxico denominado de éster de forbol presente principalmente na sua semente. Este composto é denominado de 12-dioxi-10-hidroxi-forbol, um diterpeno poliinsaturado (Solsoloy e Solsoloy, 1997; Santos *et al.*, 2008).

Outras atividades como ação antiviral e tumoral foram atribuídas ao extrato de seus galhos e o extrato de todas as suas partes demonstrou possuir atividade cicatrizante. Atividade abortiva também foi demonstrada pela ação de vários extratos de *J. curcas* produzidos por diferentes solventes e o látex presente nessa planta mostrou-se eficiente na ação contra o vírus do mosaico do melão (Kumar e Sharma, 2008). São várias as biomoléculas ativas presentes nesse vegetal. Nas folhas predomina a presença de flavonóides, glicosídeos, esteróides e alguns tipos de álcoois. No látex é predominante a protease curcina e nas sementes ésteres de forbol, como anteriormente citado (Staubmann *et al.*, 1999).

Além de suas propriedades medicinais o uso de *J. curcas* para diferentes propósitos é reconhecido na literatura. Seu uso como cerca viva em campos de agricultura é típico na Índia e em regiões áridas e semi-áridas do Brasil (Santos *et al.*, 2008). A glicerina resultante

da extração do biodiesel pode ser usada para a fabricação de sabão e o seu cultivo também ajuda a prevenir a erosão do solo recuperando áreas degradadas (Kumar e Sharma, 2008).

2.2.3.2.2 – O óleo de *J. curcas*

As sementes de *J. curcas* são conhecidas pela grande quantidade e boa qualidade de óleo produzido, que atualmente possui valor extremamente relevante para a produção de biodiesel no Nordeste brasileiro. O óleo extraído das sementes possui grande potencial como combustível tornando-se uma alternativa como nova forma de produção de energia. Com isso, a expansão da cultura do pinhão manso no Nordeste atualmente é fato crescente (Santos *et al.*, 2008).

Existem dois tipos de processos de extração para a obtenção do óleo: o mecânico e químico. A extração mecânica é feita com ajuda de um moinho ou aparelho manual que serve para prensar e triturar as sementes. O rendimento da extração torna-se maior quando as sementes são previamente cozidas, passando de 70 para cerca de 90% do total. Por outro lado, a extração química consiste no uso de solventes químicos (metanol, hexano, acetona, entre outros) utilizados ou não em determinadas condições de temperatura e pH. A forma de extração mais utilizada e que possui maior rendimento, cerca de 99%, é a extração feita por *n*-hexano como solvente, tanto a frio como a quente. De forma geral a extração química possui maior rendimento e menor mão de obra que o processo mecânico, o único problema é o possível impacto ambiental que pode causar em extrações de grande porte (Achten *et al.*, 2008).

Além de servir como biocombustível o óleo de *J. curcas* também apresenta atividade medicinal. Possui forte ação purgativa e é usado para doenças de pele e no tratamento das dores causadas pelo reumatismo. A ação inseticida do óleo puro e do seu extrato também é relatada na literatura (Kaushik e Kumar, 2004; Kumar e Sharma, 2008).

Após a produção do óleo de pinhão manso como biodiesel há a formação de um subproduto denominado popularmente de “torta”, que é o resto da semente em pó composta por produtos com alta toxicidade como o éster de forbol e a curcina, uma proteína. Estes compostos químicos são relatados na literatura por desempenharem ação hemolítica e abortiva

em ratos, biocida para insetos e antimicrobiana, com alguns trabalhos avaliando sua atividade para o controle do vírus HIV (Gandhi *et al.*, 1995).

Por possuir alto índice de toxicidade a “torta” não pode ser utilizada para a alimentação do gado ou animais domésticos como galinhas. Contudo, pode ser aplicada como adubo orgânico, por possuir grandes concentrações de proteínas e micronutrientes, e na produção de biogás (Staubmann *et al.*, 1999).

Referências

ACHTEN, W.M.J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y.J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and uses. *Biomass and Bioenergy*, 2008.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; JÚNIOR, C. M.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian archives of biology and technology*, v.49, p.527-535, 2006.

ALMEIDA, M. A. N. Monitoramento da formação de biofilmes em torre de refrigeração. In: Conferência sobre Tecnologia de Equipamentos, 6, Rio de Janeiro, 2002. **Resumos**, Rio de Janeiro, COTEQ publicações, p.2-5.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem /leaves and flowers. *Journal Agriculture Food Chemical*, v.54, p.4364-4370, 2006.

ANTONY, P. J.; RAMAN, R. K. S.; MOHANRAM, R.; KUMAR, P.; RAMAN, R. Influence of thermal aging on sulfate-reducing bacteria (SBR) – influenced corrosion behavior of 2205 duplex stainless steel. *Corrosion Science*, v.50, p.1858-1864, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR/7413 – Julho/1982.

American Society for Testing and Materials (ASTM) Standards. Norma G1/03. 1984.

American Society for Testing and Materials (ASTM) Standards. Norma G31. 1984.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.446-475, 2008.

BAYLISS, C. E.; WAITES, W. M. The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal General Microbiology*, v.96, p.401-407, 1976.

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

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.

BHOSALE, S. H.; NAGLE, V. L.; JAGTAP, T. G. Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine Biotechnology*, v.4, p.111-118, 2002.

BORGNE, S.; ROMERO, J. M.; VILLALOBOS, G.; VIDELA, H. A. Detecting and monitoring bacteria in seawater injection systems. *Materials Performance*, p.52-56, Novembro, 2007.

BOTT, T. R. Aspects of biofilm formation and destruction. *Corrosion Reviews*. v.11, p.1-24, 1993.

BRAGA, R. M. *Uso de argilominerais e diatomita como adsorvente de fenóis em águas produzidas na indústria de petróleo*. 2008. 95f. Centro de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review. *International Journal Food Microbiology*, v.94, p.223-253, 2004.

CAMARA, C. A. G.; NEVES, I. A.; OLIVEIRA, J. C. S.; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. *Journal of Oils Research*, v.20, p.157-160, 2008.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v.31, p.1-9, 2000.

CAVALCANTI, V. O. *Atividade antimicrobacteriana do óleo essencial de Lippia gracilis Schauer*. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado). Centro da Ciência e da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Recife – PE.

Center of Disease Control and Prevention (CDC), Janeiro de 2002. Disponível em: <www.medscape.com>, acessado em Julho de 2008.

Center of Biofilms Engineering. Bozeman: Montana State University, 1996. Disponível em: <www.cbe.com>, acessado em Julho, 2008.

CHANG, I.; GILBERT, E. S.; ELIASHBERG, N.; KEASLING, J. D. A three-dimensional, stochastic simulation of biofilm growth and transport-related factors that affect structure. *Microbiology*, v.149, p.2859-2871, 2003.

CHAPMAN, J. S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.41, p.241-245, 1998.

CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: a process analysis. *Microbial Adhesion and Aggregation*, New York, 1984.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, v.121, p.1-17, 2007.

COELHO, E, P, M.; MACHADO, S. F.; CUNHA, J. D.; SILVA, D. R. Estudo físico-químico de fluidos escoados em oleodutos como forma de avaliação do seu potencial corrosivo. In: Congresso Brasileiro de Corrosão, Rio de Janeiro, 2006.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M. *Microbiological methods*. 7. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1995. 493p.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. G.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICCKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. v.41, p.453-464, 1987.

DA SILVA, R. C. B.; PONTES FILHO, T. R. Corrosão de aço carbono em meio sulfato na presença da bactéria *Salmonella anatum*. *Revista Matéria*. v.13, n.2, p.282-293, 2008.

DENKHAUS, E. Chemical and physical methods for characterization of biofilms. *Microchimica Acta*. v.158, p.1-27, 2006.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal Applied Microbiology*, v.88, p.308-316, 2000.

DUAN, J.; WU, S.; ZHANG, X.; HUANG, G.; DU, M.; HOU, B. Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater. *Electrochimica Acta*, v.54, p.22-28, 2008.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology*, v.15, p.155-156, 2002.

ELMINA, E. I.; AHMED, S. A.; MEKKAWI, A. G.; MOSSA, J. S. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*, v.38, p.747-748, 1983.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito para modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

FOIDL, N.; KASHYAP, A. Exploring the potential of *Jatropha curcas* in rural development and environmental protection. *Rockefeller Foundation*. New York, 1999.

FORSON, F.K.; ODURO, E. K.; HAMMOND-DONKOH, E. Performance of *Jatropha* oil blends in a diesel engine. *Renewable Energy*, v.29, p.1135-1145, 2004.

FLEMMING, H-C. Biofilms and environmental protection. *Water Science Technology*. v.27, n.7-8, p.1-10, 1993.

FLETCHER, M. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *Journal Genetic Microbiologic*, v.94, p.400-404, 1976.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilm on surfaces. *Progress in Natural Science*, v.18, p.1049-1056, 2008.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Toxicological studies on ratanjyot oil. *Food Chemical Toxicology*, v.33, n.1, p.39-42, 1995.

GEORGE, J.; PURUSHOTHAMAN, C. S.; SHOUCHE, Y. S. Isolation e characterization of sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio vulgaris* from Vajreshwari thermal springs in Maharashtra, India. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.24, p.681-685, 2008.

GENTIL, V. *Corrosão*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos S. A. 3ª ed. 1996.

GenBank. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em Março de 2009.

GÓMEZ DE SARAIVIA, S. G.; GAYLARD, S. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overreview. *Latin American Applied Research*, v.35, p.295-300, 1998.

GUBITZ, G. M.; MITTELBAACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*, v.67, p.73-82, 1999.

GUEVARA, R.; ROSALES, J.; SANOJA, E. Vegetación pionera sobre rocas, um potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. *Interciencia*, v.30, n.10, p.644-651, 2005.

GUIAMET, P. S.; SARAIVIA, G. G. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. *Latin American Applied Research*. v.35, p.295-300, 2005.

GUBITZ, G. M.; MITTELBAACH, M., TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*, v.67, p.73-82, 1999.

GUIAMET, P. S.; SARAIVIA, G. G.; ARENAS, P.; PÉREZ, M. L.; DE LA PAZ, J.; BORREGO, S. F. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. *Pharmacologyonline*. v.3, p.537-544, 2006.

GRAM, C. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschitte der Medicine*, v.2, p.185-189, 1884.

GREEN, S. J. Don't panic: A guide to denaturing gradient gel electrophoresis. v.2, p.1-32, 2005.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I. E.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components of Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.9, p.3590-3595, 1998.

HELLER, J. *Jatropha curcas* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. *Physic nutria*. 1996.

JACK, T. R. Biological Corrosion Failures. *Failures analysis and Prevention*, v.11, p.881-890, 2002.

JAN-ROBLERO, J. ROMERO, J. M. AMAYA, M. LE BORGNE, S. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *Appl. Microbial Biotechnology*, v.64, p.862-867, 2008.

JAVAHERDASHTI, R.; RAMAN, R. K. S.; PANTER, C.; PERELOMA, E. V. Microbiologically assisted stress corrosion cracking of carbon steel in mixed and pure cultures of sulfate reducing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.58, p.27-35, 2006.

KARGI, F.; EKER, S. Removal of 2,4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochemical*, v.40, p.2105-2111, 2005.

KAUSHIK, N.; KUMAR, S. *Jatropha curcas* L.: silviculture and uses. *Agrobios*. 2004.

KHELIFI, E.; BOUALLAGUI, H.; FARDEAU, M-L.; TOUHAMI, Y.; GODON, J-J.; CAYOL, J-L.; OLLIVIER, B.; HAMDI, M. Fermentative and sulphate-reducing bacteria associated with treatment of an industrial dye effluent in an up-flow anaerobic fixed bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v.45, p.136-144, 2009.

KIBANE II, J. J.; BOGAN, W. Environmentally benign mitigation of microbiologically influenced corrosion (MIC). *Ninth Quarter Report, Gas Technology*, p.1-17, 2004.

KUNLE, O. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, v.10, p.59, 2003.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of food Microbiology*. v.42, p.9-27, 1998.

KUMAR, C. G.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas L.*): a review. *Industrial Crops and Products*. v.28, p.1-10, 2008.

LAMBERT, R. J. W.; SJANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, v.91, p.453-462, 2001.

LARSEN, L. M.; NIELSEN, T. H.; PLOGER, A.; SORENSEN, H. Rapid and efficient method for the isolation and characterization of plant aromatic choline enterases. *Journal Chromatographic*, v.450, p.121-131, 2006.

LE-BORGNE, S.; ROMERO, J. M.; VILLALOBOS, J. L. G.; VIDELA, H. A. Detecting and monitoring bacteria in seawater injection systems. *Material Performance*. p.52-56. Novembro, 2007.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; McCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, v.4, p.82-84, 1990.

LEWANDOWSKI, Z.; STOODLEY, P.; ROE, F. Internal mass transport in heterogeneous biofilms. Recent advances. *Corrosion*. n.222, 1995.

LOWE, K. L.; BOGAN, B. W.; SULLIVAN, W. R.; CRUZ, K. M. H.; LAMB, B. M.; KILBANE II, J. J. Development of an environmentally benign microbial inhibitor to control internal pipeline corrosion. *Eleventh Quarter Report*. April-July, 2004.

LIMA, M. C. L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; SANTIAGO, G. M. P.; MATOS, F. J. A.; ARRIAGA, A. M. C.; OLIVEIRA, J. P. P.; SANT'ANA, A. E. G. Composition and biological activities of *Lippia* aff. *Gracilis* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds*, v.44, n.2, p.254-256. 2008.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. *Microbiologically Influenced Corrosion*. Inc. John Wiley & Sons, 2007. 22p.

LUO, M. J.; YANG, X. Y.; LIU, W. X.; XU, Y.; HUANG, P.; YAN, F. Expression, purification and anti-tumor activity of curcin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v.38, p.663-668, 2006.

MACÊDO, Jorge Antonio Barros. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. *Revista Fármacos & Medicamentos*, v.2, n.7, p. 19-24, Nov/Dez. 2000.

MAGOT, M. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.77, p.103-116, 2000.

MAINIER, F. B.; SILVA, R. R. C. M. As formulações inibidoras de corrosão e o meio ambiente. *Engevista*, v.6, n.3, p.106-112, 2004.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potencial and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal Agricola Food Chemical*, v.45, p.3152-3157, 1997.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochimica Acta*, v.52, p.7670-7680, 2007.

MARRETO, R. N.; ALMEIDA, E. E. C. V.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S.; NUNES, R. S.; MATOS, C. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta*, v.475, p.53-58, 2008.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal General Microbiology*, v.68, p.337-348, 1971.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; SILVA, M. G. V. Medicinal plants Northeast Brazil containing thymol and carvacrol-*Lippia sdoides* Cham. and *L. gracilis* H. B. K (Verbeneacea). *Journal of Essential Oils Research*, v.11, p.666-668, 1999.

McCarthy, 1996. Disponível em <www.technelysium.com.au>, acessado em Julho, 2009.

MEHANNA, M.; BASSEGUY, R.; DELIA, M. L.; GIRBAL, L.; DEMUEZ, M.; BERGEL, A. New hypotheses for hydrogenase implication in the corrosion of mild steel. *Electrochimica Acta*. doi:10.1016/eleacta.2008.02.101. Article in Press.

MIRANDA, E.; BETHENCOURT, M.; BOTANA, F. J.; CANO, M. J.; SÁNCHEZ-AMAYA, J. M.; CORZO, A.; GARCÍA DE LOMAS, J.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexico oil field separator. *Corrosion Science*, v.48, p.2417-2431, 2006.

MYERS, F. Biocidal agents: modes of action and correlation with antibiotic resistance. *The Biomedical Scientist*, p.227-237, 2008.

NORTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing in plants: a review. *Biofouling*, v.5, p.1-16, 1991.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, v.19, p.1-15, 2000.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology*, v.54, p.49-79, 2000.

OLOFSSON, A-N.; HERMANSSON, M.; ELWING, H. *N*-Acetyl-L-Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.8, p.4814-4822. Agosto, 2003.

OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. Efeito do óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. *Revista Ciência Agronômica*, v.39, n.01, p.94-100, Janeiro-Março, 2008.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.76, p.201-214, 2001.

PCR. Disponível em <www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.fiq>. Acessado em Março, 2009.

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

PEREIRA, Maria Olivia Baptista de Oliveira. *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. 2001. 234 p. Tese (Doutorado) Universidade do Minho, Braga – Portugal.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; JUNIOR, M. G. C. G.; CÂMARA, C. A. G. Atividade inseticidas de óleos essenciais e fixos sobre *Collosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (*Coleoptera: Bruchidae*) em grãos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, n.3, p.717-724, 2007.

PENNA, M. O.; BAPTISTA, W.; BRITO, R. F.; SILVA, E. D.; NASCIMENTO, J. R.; COUTINHO, C. M. L. M. Sistema dinâmico para avaliação de técnicas de monitoração e controle da CIM. *Boletim técnico do Petrobras*, v.45, n.1, p.26-33, Jan/Mar., 2002.

PENNA, M. O.; OLIVEIRA, H. B.; SILVA, E. D. Avaliação da atividade metabólica (produção de H₂S) de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS). *Boletim técnico do Petrobras*, v.46, n.(3/4), p.208-219, Jul/Dez. 2003.

PIMENTA, M.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; SALIMENA, F. R. G.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. Floração, germinação e estaquia em espécie de *Lippia* L. (*Verbenaceae*). *Revista Brasileira de Botânica*, v.30, n.2, p.211-220, 2007.

POSTGATE, J. R. *The sulphate-reducing bacteria*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 208p.

RAMEY, B. E.; KOUTSOUDIS, M.; BODMAN, S. B. V.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, p.602-609, 2004.

REDDY, M. V.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, v. 47, n. 8, p. 1515 – 1520, 1998.

ROSSI, C. G. F.; JR, H. S.; MACIEL, M. A. M.; DANTAS, T. N. C. Estudo comparativo da eficiência da difenilcarbazida e do óleo de coco saponificado microemulsionado na inibição da corrosão em aço carbono. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1128-1132, 2007.

ROMERO, J.M.; VELÁZQUEZ, E.; VILLALOBOS, J. L.; AMAYA, M.; LE BORGNE, S. Genetic monitoring of bacterial populations in a seawater injection system. Identification of biocide resistant bacteria and study of their corrosive effect. In: **CORROSION NACE EXPO – ANNUAL CONFERENCE AND EXPOSITION**, 05483, 2005, Houston –Texas. Resumos. Texas: NACE International, Publications Division. p.1 – 6.

RUBIO, C.; OTT, C.; AMIEL, C.; MORAL, I. D.; TRAVERT, J.; MARIEY, L. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. *Journal of Microbiological Methods*, v.64, p.287-296, 2006.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52, n.5, p.750-763, 2003.

SANTOS, M. L. *Florística e biologia reprodutiva de espécie de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual da Serra de Pireneus, Goiás*. 2003. 159f. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília – DF.

SANTOS, W. L. C.; FRANÇA, F. A.; LOPEZ, L. B.; SILVA, G. M. S.; AVELAR, K. E. S.; MORAES, S. R. Atividades farmacológicas e toxicológicas da *Jatropha curcas* (pinhão-mansão). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.89, n.4, p.333-336, 2008.

SARAVIA, S. G. G.; GAYLARDE, C. C. The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Brassica negra*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.41, p.145-148, 1998.

SEGANTINI, E.; DANTAS, S. T. Aplicação da microscopia eletrônica de varredura para a avaliação de embalagens. *Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens*, v.8, n.2, p.1-9, Março/Abril, 1996.

SHANKER, C.; DHYANI, S. K. Insect pests of *Jatropha curcas* L. and the potential for their management. *Current Science*, v.91, p.162-163, 2006.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. The influence of ionic strength, nutrients and pH bacterial adhesion to metals. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.321, p.256-264, 2008.

SILVA, P. S. *Verbenaceae da Serra do Cipó: aspectos biosistemáticos, químicos e farmacológicos*. 2008. 206f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, v.14, n.9, p.389-397, 2006.

SOLSOLOY, A. D.; SOLSOLOY, T. S. Pesticidal efficacy of formulated *J. curcas* oil on pests of selected field crops. *DBV Graz*, p.216-226, 1997.

SOUZA, E. A. *Avaliação de inibidores de corrosão para sistema de resfriamento industrial operando com ciclo elevado de concentração*. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

STAUBMANN, R.; FOIDL, G.; FOIDL, N.; GUBITZ, G. M.; LAFFERTY, R. M.; ARBIZU, V. M.; STEINER, W. Biogas production from *Jatropha curcas* press cake. *Appl. Biochemical Biotechnology*, v.63, p.457-467, 1999.

STARKEY, R. L. The general physiology of the sulphate-reducing bacteria in relation to corrosion. *Producers Monthly*, p.12-30, 1958.

SURMAN, S. B.; WALKER, J. T.; GODDARD, D. T.; MORTON, L. H. G.; KEEVIL, C. W.; WEAVER, W.; SKINNER, A.; CALDWELL, D.; KURTZ, J. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, v.25, p.57-70, 1996.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiology*, v.9, p.222-227, 2001.

TAVARES, W. *Manual de antibióticos para o estudante de medicina*. 3. ed. Rio de Janeiro/São Paulo: Livraria Atheneu, 1982. 374p.

TAKASAKI, M.; SUDO, R.; NISHIMURA, O.; KIM, H. Y. Simultaneous removal nitrogen am THM precursor by developed submerged biofilm process for drinking water. *Water Scientiae Technologia*, v.26, n.9-11, p.2021-2024, 1992.

TEBALDI, V. M. R. *Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de Pseudomonas sp. e na formação de biofilmes por Pseudomonas aeruginosa*. 2008. 94f. Tese (Doutorado). Departamento de Microbiologia de Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

TENG, F.; GUAN, Y. T.; ZHU, W. P. Effect of biofilm on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution system: corrosion scales characterization and microbial community structure investigation. *Corrosion Science*, v.50, p.2816-2823, 2008.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (*Verbenaceae*): a literature review. *Journal of Essential Oil Research*, v.2, n.5, p.471-485, 1996.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGLADO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemical*, v.122, p.101-113, 2006.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, n.10, p.4606-4610, Outubro, 1999.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal Chromatography*, v.11, p.463-471, 1963.

VIDELA, H. A. *Biocorrosão, biofouling e biodegradação de materiais*. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2003. 148 p.

VIDELA, H. A. Microbially induced corrosion: a updated overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.48, p.176-201, 2001.

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

VIDELA, H. A.; GUIAMET, P. S.; GÓMES DE SARAVIA, S. G.; GAYLARDE, C. C. Environmentally friendly approaches to inhibit biocorrosion. *Corrosion*, 2004.

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

XU, C.; ZHANG, Y.; CHENG, G.; ZHU, W. Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Characterization*, v.59, p.245-255, 2008.

YU LIU; TAY, J. H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, v.36, p.1653-1665, 2002.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, v.46, p.39-56, 1943.

ZOLTAI, P. T.; ZOTOLLA, E. A.; McKAY, L. L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *Journal of Food Protect*, v.44, p.204-208, 1981.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)