

Copyright 2016, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2016, em Búzios/RJ no mês de maio de 2016.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato

Priscila Santos da Silva^a, Lilian Ferreira de Senna^b, Márcia M.M Gonçalves^c, Dalva C. B. do Lago^d

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are the most important microorganisms involved in the microbiologically-influenced corrosion (MIC). One way to prevent and control this type of corrosion is the addition of biocides to the corrosive environment. This work aims to evaluate the use of biocides as inhibitor to control MIC of AISI 1020 carbon steel by SRB. A natural biocide (garlic oil) and a commercial one (glutaraldehyde) were used to control the corrosion caused by these bacteria after the formation of biofilms on the metal surface. Microbial growth on the steel surface was evaluated by quantifying the sessile SRB using the most probable number method (MPN). The action of biocides on the biocorrosion process was studied by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and potentiodynamic polarization. The biofilm formation and the corrosion products on the steel surface were observed by scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the glutaraldehyde was able to reduce the number of sessile cells and to avoid the acceleration of corrosion of carbon steel. The garlic oil presented a less effective action, as it could not penetrate into the biofilm matrix completely. Therefore, the continuation of the corrosion process on carbon steel was not prevented using this biocide.

Keywords: Microbiologically-influenced corrosion, sulfate-reducing bacteria, electrochemical techniques, biocides, garlic oil, glutaraldehyde.

Resumo

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são os principais micro-organismos envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Uma das formas de prevenir e controlar esse tipo de corrosão é a adição de biocidas ao meio corrosivo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de biocidas como inibidor da CMI do aço carbono AISI 1020 por BRS. Um biocida natural (óleo de alho) e outro comercial (glutaraldeído) foram utilizados para controlar a corrosão causada por BRS após a formação de biofilme na superfície do metal. O crescimento microbiano na superfície do aço foi avaliado através da quantificação das BRS

^aMSc-Aluno de Doutorado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^bDSc-Professor Adjunto - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^cDSc-Professor Adjunto - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^dDSc-Professor Adjunto - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

sésseis, pelo método do número mais provável (NMP). A ação dos biocidas sobre o processo de biocorrosão foi estudada através de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e polarização potenciodinâmica. A formação de biofilme e de produtos de corrosão na superfície do aço foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que o glutaraldeído conseguiu reduzir o número de células sésseis e também foi capaz de evitar a aceleração da corrosão do aço carbono. O óleo de alho apresentou uma ação menos efetiva, pois não conseguiu penetrar completamente na matriz do biofilme. Assim, a continuidade do processo corrosivo no aço carbono não foi impedida pelo uso desse biocida.

Palavras-chave: Corrosão microbiologicamente induzida, bactérias redutoras de sulfato, técnicas eletroquímicas, biocidas, óleo de alho, glutaraldeído.

Introdução

Corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é o termo utilizado para designar a corrosão devido à presença e atividades de micro-organismos(1). Os micro-organismos aderem às superfícies formando biofilmes, que podem influenciar a corrosão através de alterações nas condições eletroquímicas na interface metal/solução (2).

O principal grupo de micro-organismos envolvidos no processo de biocorrosão são as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Estas bactérias reduzem o íon sulfato, tendo como resultado a produção de sulfeto de hidrogênio (dependendo do pH do meio), o que pode influenciar os processos anódico e catódico na corrosão de materiais metálicos em ambientes marinhos, óleos e solos úmidos (3)

O uso de métodos de prevenção e controle se faz necessário para tentar evitar ou amenizar os efeitos da atividade microbiana sobre metais. Dentre os métodos utilizados no controle e prevenção da CMI, destaca-se o tratamento com biocidas, os quais são utilizados para prevenir, inibir ou eliminar o crescimento de micro-organismos (4). Os biocidas são muito utilizados para controlar a biocorrosão, porém a maioria apresenta a desvantagem de ser tóxico para o ambiente. Assim, os compostos naturais, tais como extratos de plantas e de alimentos podem ser considerados como uma forma ambientalmente favorável no tratamento da biocorrosão e vêm sendo explorados atualmente como uma alternativa aos biocidas comerciais (5, 6). Dentre os compostos naturais, o alho apresenta-se como uma possibilidade no tratamento da biocorrosão, já que este possui propriedades bactericidas (7-9) e também pode agir como inibidor natural de corrosão para o aço carbono em meio ácido (10, 11).

O aço carbono é um material muito utilizado na indústria de petróleo e gás e também em estruturas presentes em ambientes marinhos. Dessa forma, faz-se necessário avaliar o comportamento das BRS na corrosão do aço e tentar evitar os problemas relacionados com este tipo de corrosão utilizando métodos de prevenção e controle. Assim, este trabalho propôs a avaliação da ação de biocidas no controle da CMI do aço carbono AISI 1020 em água do mar sintética, empregando um biocida natural (óleo de alho) e um biocida comercial (glutaraldeído).

Metodologia

Corpos de prova

Foram utilizados cupons metálicos de aço carbono AISI 1020 cuja composição química em % massa está descrita na Tabela 1 (12). Dois tipos de cupons foram utilizados, conforme descrito a seguir.

Tabela 1- Composição química do aço carbono AISI 1020

Elemento	C	Mn	P	S _{máx}	Si	Cu	Cr	Ni
Massa (%)	0,16	0,63	0,012	0,031	0,012	0,01	0,03	0,01

Ensaio de quantificação celular – foram utilizados cupons com dimensões em torno de 2 cm x 1,8 cm x 0,1 cm e área média de aproximadamente 8 cm². Os cupons foram lixados em ambas as faces com lixas d'água de 100 mesh a 600 mesh de granulometria, lavados com água destilada e álcool etílico e secos com jato de ar quente.

Ensaio eletroquímico - foram utilizados cupons com dimensões em torno de 1,8 cm x 1,7 cm x 0,1 cm) e área média exposta de aproximadamente 3 cm². Um fio condutor de cobre foi soldado em cada cupom metálico para proporcionar a conexão elétrica do sistema e embutidos em resina epóxi para que apenas uma de suas faces ficasse exposta ao meio corrosivo. O processo de lixamento e limpeza dos eletrodos foi o mesmo usado para os ensaios de quantificação celular.

Fluido de Processo e Meio de Cultura

A cultura bacteriana utilizada no presente trabalho foi uma cultura mista contendo o grupo de bactérias conhecido como bactérias redutoras de sulfato (BRS). A cultura foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

O fluido de processo escolhido para ser utilizado em todos os ensaios foi água do mar sintética(13). Esta foi utilizada para o preparo dos meios de cultura, para os ensaios com biocidas e também para a realização dos ensaios eletroquímicos (eletrolito).

O meio de cultura utilizado para o cultivo das BRS foi o meio Baar's modificado (adaptado de ATTC meio 1249), o qual foi preparado em condições de anaerobiose, sob purga de gás nitrogênio, pois as BRS são micro-organismos anaeróbios. O pH do meio foi ajustado para 7,5 (pH ideal para o crescimento das BRS) adicionando-se solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Biocidas

Foram utilizados dois biocidas nos ensaios, sendo um comercial e um natural. O biocida comercial foi uma solução de glutaraldeído 25% (Sigma Aldrich). O biocida natural escolhido foi óleo de alho (Alhonat Nativa), em cápsulas contendo 250 mg de óleo cada.

Para a realização dos ensaios contendo biocidas foram estudadas concentrações diferentes para cada composto, sendo 0,01 % m/v para o glutaraldeído e 3% m/v para o óleo de alho

Sistema utilizado para os ensaios

Primeiramente foi realizado um acompanhamento do crescimento microbiano durante 35 dias, visando avaliar o crescimento das BRS ao longo do tempo e definir a duração dos ensaios com aplicação dos biocidas.

Os ensaios foram realizados em frascos de 100 mL, denominados reatores. Para o ensaio controle (na presença de BRS sem adição de biocida) foi adicionado ao reator 80 mL do meio de cultura Baar's inoculado à 10% v/v com a cultura mista contendo BRS. O ensaio controle teve duração de 7 dias e após este tempo foram realizadas as análises de MEV e os ensaios eletroquímicos.

A aplicação dos biocidas foi realizada após a formação de biofilme, para verificar seu efeito bactericida. Assim, os cupons foram inicialmente adicionados aos reatores inoculados com a BRS e permaneceram em contato com a solução por 7 dias, visando a formação do biofilme. Depois de formado o biofilme, os cupons foram transferidos, assepticamente, para reatores contendo água do mar sintética estéril e os biocidas. No ensaio com óleo de alho foi adicionado um surfactante, laurato de potássio na concentração de 10^{-3} mol L⁻¹, pois o óleo não é solúvel em solução aquosa (14). O tempo de contato do cupom com os biocidas foi de 24 h, e após esse período foram realizados os ensaios de quantificação microbiana, MEV e eletroquímicos.

Quantificação Microbiana

A quantificação microbiana foi feita apenas para as células sésseis, sendo o cupom metálico removido assepticamente do meio, lavado cuidadosamente por imersão em água destilada, para a remoção de células livres, e transferido para um tubo falcon contendo a solução de diluição(15). Em seguida, para remover o biofilme aderido, o tubo contendo o cupom foi agitado em vórtex por 4 min e sonificado em sistema de limpeza ultrassônica por 2 min. Após a remoção do biofilme, foram retiradas alíquotas da suspensão para quantificação.

A quantificação foi realizada através do método do número mais provável (16) utilizando o meio de cultura Postgate E (17). O tempo de incubação após inoculação foi de 28 dias a temperatura de 30°C.

Ensaio Eletroquímico

Os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando o potenciostato Autolab modelo PGSTAT302N, com uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: o eletrodo de trabalho (eletrodo de aço carbono), o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e um contra-eletrodo de platina.

Nos ensaios de EIE foi utilizada uma faixa de frequência de 10^5 Hz a 10^{-3} Hz, com uma amplitude de 10 mV. Para os ensaios de polarização potenciodinâmica, a faixa de potencial aplicada foi de -1 V a 1 V, com velocidade de varredura de 1 mVs⁻¹. Todos os ensaios

eletroquímicos foram feitos após estabilização do sistema em seu potencial de circuito aberto. O eletrólito utilizado nos ensaios eletroquímicos foi água do mar sintética.

Os ensaios de EIE foram simulados através de circuitos elétricos equivalentes utilizando o software NOVA 1.10 Metrohm Autolab. O valor da capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) foi calculado a partir do elemento de fase constante (EFC), através da equação 1:

$$C_{DCE} = (EFC)^{\frac{1}{N}} \times R_{tc}^{\left(\frac{1}{N}-1\right)} \quad (1)$$

Onde:

C_{DCE} – capacitância da dupla camada elétrica

EFC – elemento de fase constante

R_{tc} – resistência de transferência de carga

N - termo que define o grau de equivalência do elemento de fase constante para um componente capacitivo

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada para o corpo de prova exposto ao meio com BRS (controle), e também para os corpos de prova inseridos nos meios com biocidas.

Os cupons foram retirados do reator e lavados cuidadosamente por imersão em água destilada, para a remoção de células livres, e em seguida foram secos em estufa a 37°C por 1 h. As amostras foram metalizadas com ouro utilizando metalizador modelo DENTON VACUUM DESK V e em seguida foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM G510 LV em alto vácuo, detector SEI e tensão de 20KV.

Para a análise de MEV após a remoção do biofilme, os cupons foram tratados por decapagem ácida em solução de Clark (12) por 2 min, sendo posteriormente lavados com água destilada e secos com jato de ar quente.

Resultados e discussão

Avaliação do crescimento microbiano

O inóculo inicial utilizado em todos os ensaios foi de $9,1 \times 10^6$ células/mL de BRS. Este valor permitiu a realização dos ensaios com uma quantidade expressiva de células, mantendo também um número de células viáveis que foram capazes de se reproduzir nas condições impostas de temperatura, pH e baixo teor de oxigênio. A quantificação microbiana foi feita para as BRS aderidas ao substrato metálico (células sésseis) com 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Os resultados obtidos na quantificação dessas células, realizadas pela técnica do NMP, estão apresentados na Figura 1.

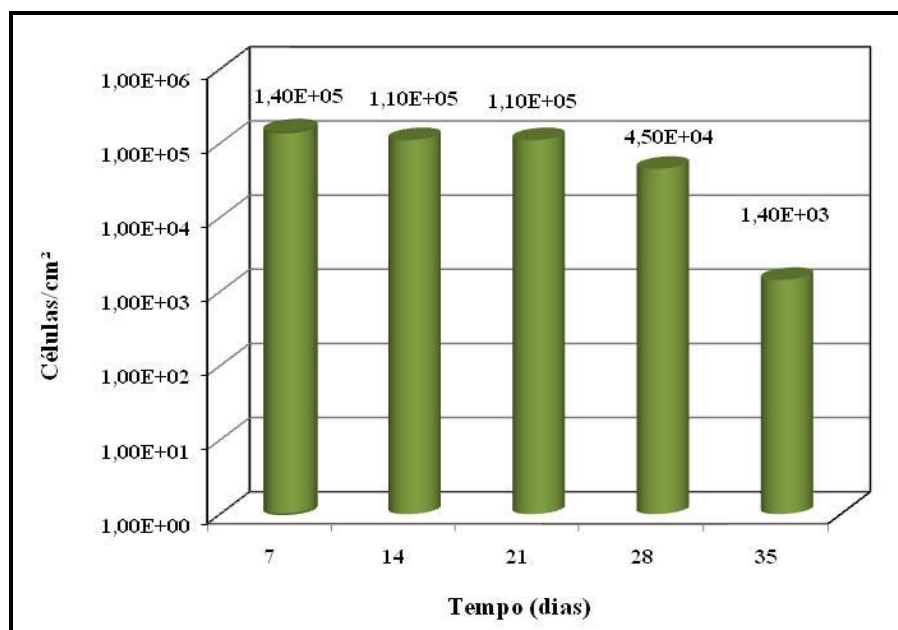


Figura 1 - Quantificação microbiana para BRS sésséis

O crescimento das células de BRS sésséis durante os 35 dias de ensaio apresentou valores que variaram entre $1,4 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^3$ células/cm². É possível notar que, embora não houvesse diferenças significativas até 21 dias de ensaio, com apenas 7 dias de crescimento a concentração de BRS já era a maior encontrada durante o tempo total do ensaio, confirmando a capacidade deste grupo de bactérias em colonizar e aderir em superfícies sólidas. BRS são capazes de produzir substâncias poliméricas extracelulares (SPE), o que favorece esta aderência (18-20). SPE consiste de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos, e sua composição varia de acordo com a espécie microbiana, estado fisiológico das células e fatores ambientais (21).

A partir do 21º dia de ensaio, o número de BRS aderidas à superfície diminuiu. Esta redução pode ser atribuída à falta de nutrientes e também pelo aumento da concentração de H₂S no meio. O acúmulo de células no biofilme está relacionado com a atividade metabólica dos micro-organismos. Assim, a formação de biofilmes depende da disponibilidade de nutrientes e também da presença e concentração de metabólitos tóxicos no meio (22).

Ensaio com biocidas

Conforme verificado no ensaio de quantificação microbiana, durante o tempo de imersão de 7 dias foi observado o maior número de micro-organismos aderidos à superfície (Figura 1). Assim, este foi o período de imersão escolhido para realização dos ensaios com biocidas.

A quantificação microbiana para as BRS sésséis, obtida através da técnica do NMP, para os ensaios com biocidas aplicados após a formação de biofilme por um tempo de contato de 24 h, em comparação com o ensaio controle, está apresentada na Figura 2.

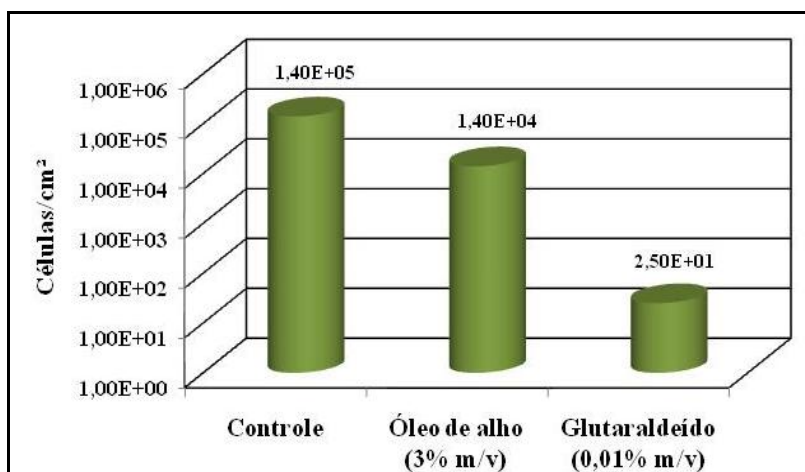


Figura 2 -Quantificação microbiana para os ensaios com biocidas em comparação com o ensaio controle

Pode-se observar na Figura 2 que a presença dos compostos estudados (óleo de alho e glutaraldeído) no meio diminuiu a quantidade de células sésseis no substrato de aço, em comparação com o ensaio controle. Contudo, aquele proposto como biocida natural (óleo de alho) reduziu a população de BRS em uma ordem de grandeza (19%), demonstrando um baixo efeito bactericida.

Sabe-se que os compostos extraídos do alho são bastante conhecidos por suas características antimicrobianas e bactericidas (7-9) e por suas propriedades antioxidantes e de inibição de corrosão (10, 11). Porém, a baixa eficácia bactericida do óleo de alho aqui observada indica que este não conseguiu penetrar completamente na matriz do biofilme. Como a atuação do óleo de alho na redução das células sésseis de BRS envolve também a adsorção superficial de seus compostos sobre o metal, os resultados sugerem que a adsorção destes compostos sobre o biofilme já formado foi dificultada.

Já o glutaraldeído apresentou uma redução de 73% da população de BRS, confirmando a eficácia deste biocida em eliminar células de BRS já estabelecidas em um biofilme. Rége e Sand (23) utilizaram glutaraldeído, também na concentração de 100 mg L^{-1} e tempo de contato de 24 h, no tratamento de biofilmes de BRS já estabelecidos. Porém, nas condições do estudo desses autores, em que os biocidas foram aplicados em biofilmes formados de 10 semanas, a população bacteriana só foi reduzida em 30%. Melhores resultados só foram encontrados quando os autores utilizaram uma maior concentração, 500 mg L^{-1} , por um tempo de contato de 7 dias. A diferença pode ser provavelmente explicada pela espécie de BRS estudada (24).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias apresentadas na Figura 3 foram obtidas com 7 dias de ensaio para o corpo de prova imerso em meio contendo BRS (controle), exibindo a adesão microbiana através da formação de biofilme (Figura 3A), e também para os corpos de prova em meio com os biocidas, óleo de alho (Figura 3C) ou glutaraldeído (Figura 3E), a fim de dificultar a formação

do biofilme. Para verificar a condição final do aço, são também mostradas micrografias realizadas após a remoção do biofilme (Figuras 3B, 3D e 3F).

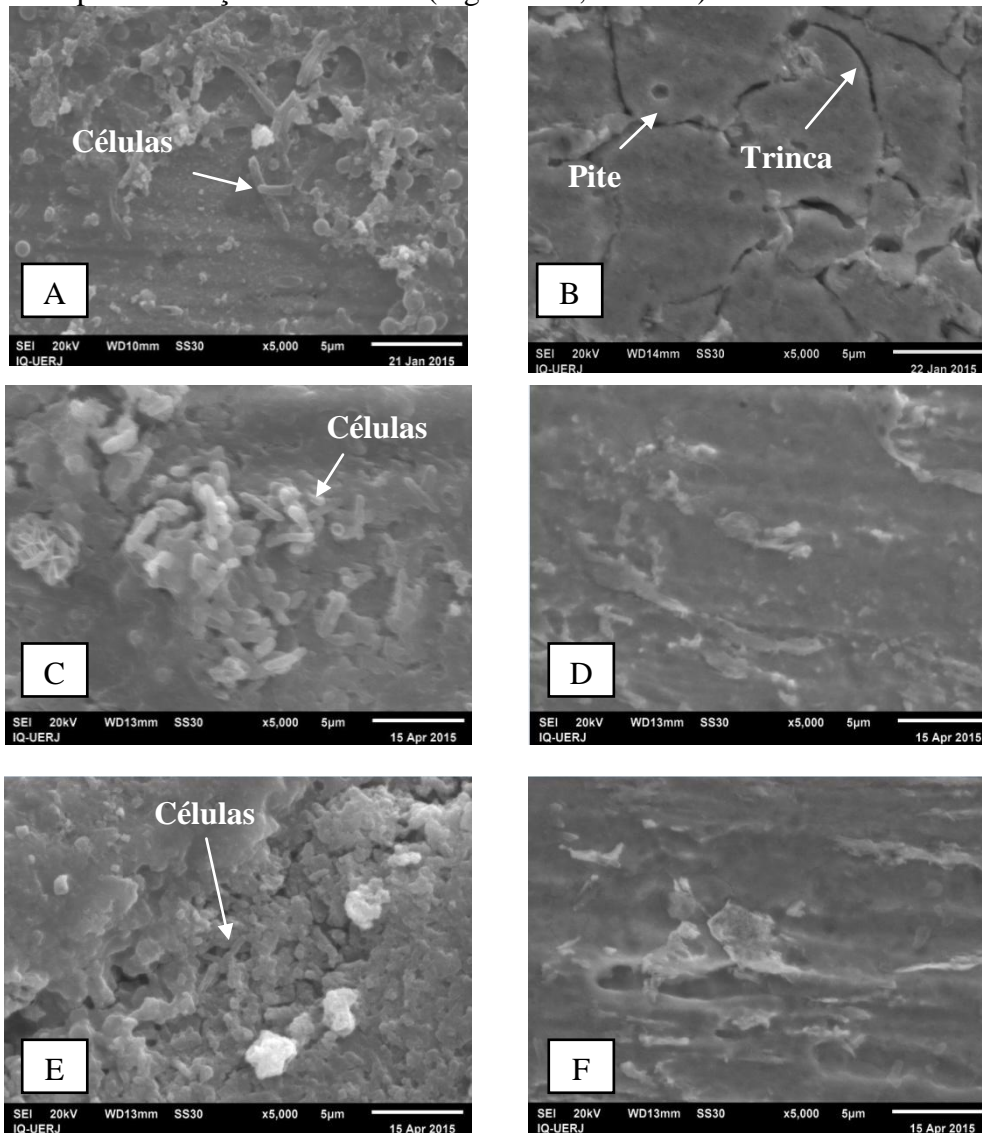


Figura 3 - Microscopia da superfície do aço carbono 1020. (A) Biofilme sem aplicação de biocidas (controle); (B) Superfície após remoção do biofilme (controle); (C) Biofilme com aplicação de óleo de alho; (D) Superfície após remoção do biofilme para óleo de alho; (E) Biofilme com aplicação de glutaraldeído; (F) Superfície após remoção do biofilme para glutaraldeído.

A Figura 3A mostra que com 7 dias de imersão do cupom no meio contendo BRS houve a formação de um aglomerado celular irregularmente distribuído na superfície do aço carbono, sendo possível visualizar bactérias no formato de bacilos e cocos. Também se observa a presença de alguns flocos na superfície, que provavelmente se devem à formação de SPE pela atividade metabólica da BRS.

Após a remoção do biofilme (Figura 3B) foi possível observar a presença de corrosão localizada por pites, bem como a formação de várias trincas em quase toda a extensão da superfície do aço, sugerindo também possível corrosão intergranular. Bholá et al. (5), Xu et al.

(25) e Alabbas et al. (26) também verificaram corrosão por pite em seus trabalhos, confirmando que a atividade metabólica que as BRS exercem na superfície do aço leva a uma aceleração da corrosão do tipo localizada.

Observando agora a Figura 3C, para a superfície do aço carbono previamente coberta com biofilme e exposta por 24 h ao meio contendo água do mar e óleo de alho, foi possível notar que a superfície do aço estava parcialmente coberta por uma película, provavelmente devido aos compostos de alho adsorvidos sobre o biofilme. Contudo, pode-se notar também a presença de BRS por baixo dessa película. Este resultado demonstra que apesar da pequena redução da população de BRS sésseis, o óleo de alho aplicado nessas condições pode ter interagido com a superfície do aço através da adsorção de seus compostos sobre o biofilme já formado.

Após a remoção do biofilme (Figuras 3D) foi possível observar a presença de corrosão uniforme e também corrosão localizada, associadas ao crescimento microbiano na superfície, já que o óleo de alho aplicado ao sistema por um tempo de contato de 24 h, aparentemente evitou a aceleração do processo corrosivo.

A Figura 3E, referente ao ensaio em que o biofilme já formado é exposto por 24 h ao meio de água do mar sintética contendo glutaraldeído, exibem a presença de um filme não homogêneo, contendo poucas células de BRS. Este resultado sugere que o glutaraldeído foi capaz de quebrar, mas não de remover o biofilme formado. O glutaraldeído, também usado como fixador celular para microscopia tem efeito endurecedor sobre o biofilme já formado, causando perda de flexibilidade e trincamento deste. Assim, pode ter causado redução no número de bactérias sésseis, mas não removeu o biofilme.

Após a remoção do biofilme com solução de Clark (Figura 3F) foi observada a presença de corrosão uniforme e localizada, neste caso também relacionadas com o crescimento prévio das BRS na superfície do metal. O glutaraldeído aplicado para esta condição de ensaio (tempo de contato de 24 h) pareceu não intensificar a corrosão da superfície do aço.

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Os diagramas de Nyquist, Bode e fase para o aço carbono 1020, em meio de água do mar sintética, para os ensaios controle e com biocidas são apresentados na Figura 4.

Observa-se, nos diagramas de Nyquist (Figura 4A), que a adição por 24 h dos produtos testados aos corpos de prova com os biofilmes já formados apresentaram pequenas variações no tamanho dos arcos capacitivos, em relação ao ensaio na ausência destes. Por outro lado, há uma maior variação dos arcos em relação ao eixo imaginário ($-Z''$), que está relacionado com a capacitância da dupla camada (C_{DCE}), principalmente para o ensaio realizado em presença de óleo de alho. Embora menos evidentes no diagrama de Bode (Figura 4B), algumas variações mais interessantes podem também ser observadas no diagrama de fase (Figura 4C), nos ensaios com a adição dos biocidas.

Para o ensaio com adição do óleo de alho, o valor máximo do ângulo de fase foi deslocado para menores valores de frequências. Isso pode significar que o óleo de alho pode ter se aderido ao biofilme já formado, originando um produto com característica mais condutora do

que o próprio biofilme. De fato, a Figura 3C mostra que o óleo de alho aparentemente se aderiu ao biofilme já formado, contribuindo para o aumento do arco capacitivo, em relação ao eixo imaginário, como observado na Figura 4A.

No caso do glutaraldeído verifica-se, também no diagrama de fase, a presença de mais de uma constante de tempo, com um primeiro máximo em médias frequências e um segundo máximo em baixas frequências. Nesse caso, o efeito biocida reduziu o número de bactérias sésseis, sem remover o biofilme, conforme observado na Figura 3E. Em ambos os casos, estas variações, juntamente com as micrografias, comprovam que mudanças podem ter ocorrido na superfície aço/biofilme com a adição dos biocidas ao meio após a formação do biofilme.

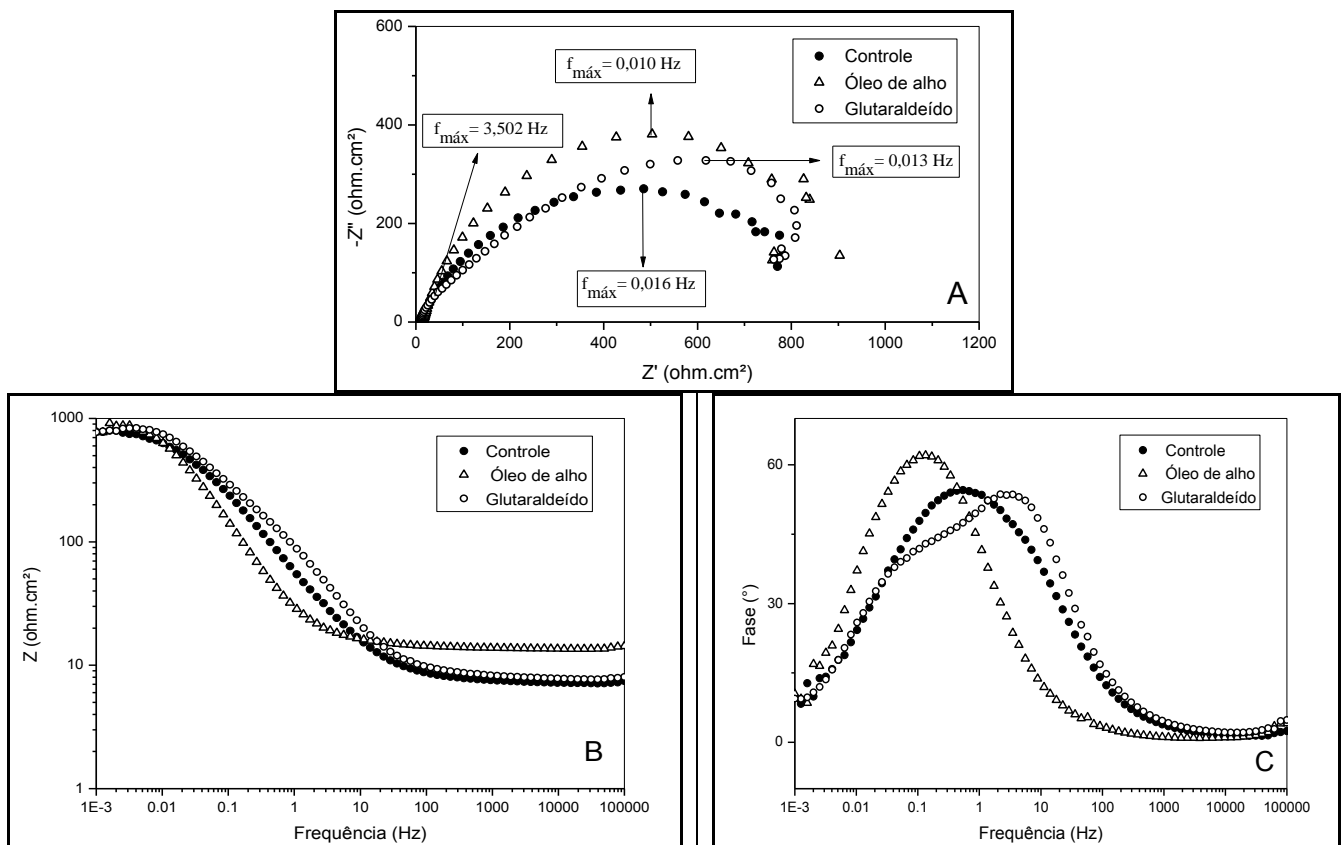


Figura 4 - Diagramas de Nyquist (A), Bode (B) e Fase (C) para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios controle e com biocidas

Os resultados de EIE podem ser interpretados em termos de modelos de circuitos elétricos equivalentes, onde os dados referentes à resistência de transferência de carga (R_{tc}) e capacitância da dupla camada elétrica (C_{DCE}) são obtidos pela simulação do processo eletroquímico (27). No presente trabalho, o circuito ilustrado na Figura 5A foi utilizado para simular os dados de impedância para os ensaios controle e com adição de óleo de alho, considerando que a interface eletrodo/solução era composta pelo aço (provavelmente recoberto por uma fina camada porosa de um produto de corrosão ou do próprio biofilme) e o meio corrosivo (28). Assim, no circuito equivalente simples proposto na Figura 5A, R_e representa a resistência do eletrólito, R_{tc} é a resistência à transferência de carga, e EFC representa o elemento de fase constante, associado com a capacitância da dupla camada elétrica (26). Como, para o glutaraldeído, notou-se a presença de mais de uma constante de

tempo, o circuito utilizado para simular os dados de EIE neste caso foi o apresentado na Figura 5B. Neste circuito, R_f e EFC_f se referem à resistência e ao elemento de fase constante do biofilme, respectivamente. O ajuste da simulação, para todos os ensaios, foi considerado bom para um valor de erro menor que 1% (29).

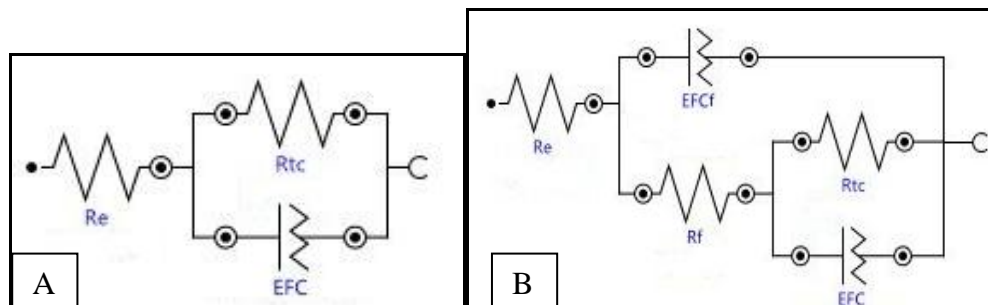


Figura 5 – Modelos de circuitos equivalentes utilizados para simular os dados de EIE. (A) Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE dos ensaios controle e com aplicação de óleo de alho. (B) Modelo de circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE do ensaio com aplicação de glutaraldeído.

Os valores de R_{ct} e de C_{DCE} , obtidos após a simulação dos dados de EIE de todos os ensaios, estão apresentados na Tabela 2. Essa tabela também apresenta os valores de N , termo que define o grau de equivalência do elemento de fase constante para um componente capacitivo(28).

Tabela 2 - Valores de R_{ct} e de C_{DCE} obtidos a partir da simulação dos dados de EIE para o aço carbono 1020, para os ensaios controle e com biocidas

	R_e (Ω)	R_{tc} ($\Omega \text{ cm}^2$)	C_{DCE} ($\mu\text{F cm}^{-2}$)	N
Controle	3,49	744	$1,67 \times 10^{-2}$	0,711
Óleo de alho	7,21	811	$2,90 \times 10^{-2}$	0,840
Glutaraldeído	4,08	819	$1,33 \times 10^{-2}$	0,663
		$R_f = 204$	$C_{DCEf} = 3,17 \times 10^{-3}$	$N_f = 0,793$

Analisando a Tabela 2, verifica-se que houve um pequeno aumento no valor de R_{tc} para o sistema aço/biofilme imerso no meio corrosivo contendo óleo de alho. Provavelmente, a adesão dos compostos do alho na superfície do biofilme dificultou o processo de transferência de carga, principalmente em função da ação do biocida proposto como inibidor de corrosão, pois o decréscimo da proliferação das bactérias sésseis durante 24 h de ensaio foi muito pequeno. Por outro lado, nota-se que houve um pequeno aumento em C_{DCE} , o que pode ser relacionado com os resultados observados no diagrama de fase e com o tipo do filme final formado. Sendo esse filme condutor e poroso, provavelmente não impedirá a continuidade do processo corrosivo do metal no meio de água do mar artificial, conforme pode ser visto nas microscopias apresentadas nas Figuras 3 C e 3D. Assim, com base nesses resultados e nos pequenos valores de redução das bactérias sésseis encontrados na quantificação microbiana, é possível sugerir que a adição do óleo de alho ao meio corrosivo estudado, após o biofilme ter se estabelecido na superfície, pode não ser uma alternativa interessante, apesar de ambientalmente não agressiva, para o controle da corrosão por BRS já existente.

Por outro lado, para o sistema aço/biofilme imerso no meio contendo glutaraldeído por 24 h, observa-se que o valor de R_{tc} aumentou em comparação com o ensaio sem a adição deste biocida. Esse resultado, juntamente com um pequeno decréscimo no valor de C_{DCE} e à presença de duas constantes de tempo (a segunda, em altas frequências, aqui denominada por R_f e C_{DCEf}) pode indicar que o glutaraldeído contribuiu para a redução no número de bactérias sésseis, favorecendo, a diminuição da corrosão do substrato. Esse resultado concorda com os resultados de quantificação (Figura 2) e de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 3E e 3F).

Polarização Potenciodinâmica

A Figura 6 apresenta as curvas de polarização potenciodinâmica catódicas e anódicas para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, para os ensaios controle e com biocidas. Os principais parâmetros eletroquímicos obtidos através da extrapolação das retas de Tafel, tais como o potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), os coeficientes de Tafel anódico (β_a) e catódico (β_c), e também a taxa de corrosão ($taxa_{corr}$) são mostrados na Tabela 3.

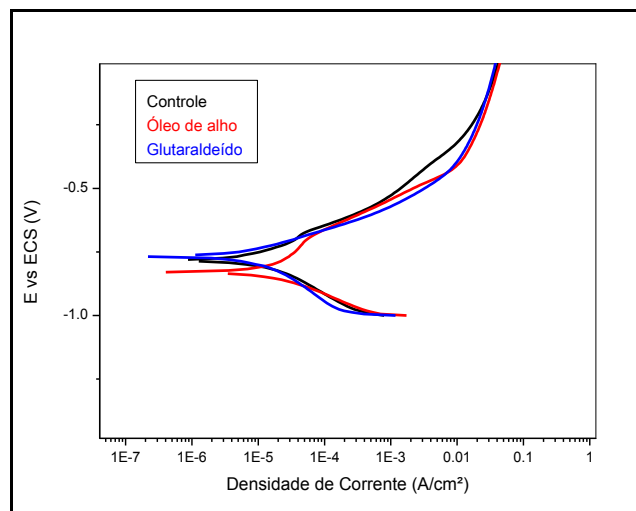


Figura 6 - Curvas de polarização para o aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética, pra os ensaios controle e com biocidas

Na Figura 6 pode-se notar que as curvas de polarização do substrato de aço no ensaio em que o biocida óleo de alho foi adicionado ao meio, depois da formação de biofilme, comportaram-se de modo diferente, quando comparadas com o ensaio controle. Houve um deslocamento dos potenciais de corrosão do substrato para valores mais negativos e a curva está deslocada para maiores valores de densidade de corrente. Esse fato sugere que um processo mais acentuado de corrosão pode ter ocorrido nessas condições, conforme também verificado nos ensaios de EIE.

Por outro lado, não foi verificado na curva relativa ao ensaio com glutaraldeído, a presença do pequeno patamar de corrente anódica observado na curva do aço nas condições do ensaio controle e do ensaio contendo óleo de alho. Esse patamar é provavelmente decorrente da

formação de produtos de corrosão na superfície do eletrodo. No caso da curva do aço no meio contendo glutaraldeído, no entanto, ocorreu a dissolução ativa do metal.

Tabela 3 - Parâmetros eletroquímicos do aço carbono 1020 em meio de água do mar sintética para os ensaios controle e com biocidas

	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm ²)	β_a (V/dec)	β_c (V/dec)	Taxa _{corr} (mm/ano)
Controle	-0,78	2,24x10 ⁻⁶	0,074	0,077	5,37x10 ⁻²
Óleo de alho	-0,83	4,35x10 ⁻⁶	0,108	0,069	1,01x10 ⁻¹
Glutaraldeído	-0,76	1,68x10 ⁻⁶	0,060	0,074	3,91x10 ⁻²

Analisando as constantes de Tafel na Tabela 3, pode-se observar que o valor de β_a para ensaio com óleo de alho aumentou significativamente. Isto comprova que a adesão deste composto ao biofilme já formado originou um filme que contribuiu para acelerar o processo corrosivo, conforme discutido anteriormente para os ensaios de EIE. A Tabela 3 também mostra que, conforme esperado, os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão aumentaram e o valor de E_{corr} foi deslocado para valores mais negativos, o que confirma a intensificação da corrosão.

Comportamento diferente foi observado para o sistema aço/biofilme em meio contendo glutaraldeído. Nesse caso, a constante de Tafel β_a diminuiu um pouco. Por outro lado, β_c praticamente não se alterou, mostrando que não houve influência do biocida na reação catódica. Os valores de I_{corr} e da taxa de corrosão obtidos na presença deste biocida diminuíram em relação ao controle, e o valor de E_{corr} foi deslocado, embora não significativamente, para valores mais positivos. Estes resultados mostram que o glutaraldeído pode ter evitado a evolução do processo corrosivo através da redução da população de BRS sésseis, corroborando os resultados de EIE e as análises microscópicas.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos para os ensaios com biocidas em comparação com o ensaio controle pode-se concluir que:

Os biocidas óleo de alho e glutaraldeído apresentaram uma redução da população de BRS sésseis de 19% e 73%, respectivamente. O óleo de alho exibiu um baixo efeito bactericida, em função da pior adsorção de seus compostos na superfície contendo o biofilme já formado. Já o glutaraldeído mostrou ser eficiente em eliminar células de BRS já estabelecidas em um biofilme.

A análise de MEV mostrou que a superfície do aço carbono, previamente coberta com biofilme, exposta ao meio contendo água do mar e óleo de alho estava quase toda coberta por uma película. Isto sugere que mesmo com o baixo efeito na redução das células sésseis de BRS, o óleo de alho aplicado nessas condições pode ter interagido com a superfície aço/biofilme. Após a remoção do biofilme foi possível observar corrosão uniforme e localizada, associadas também ao crescimento microbiano na superfície. Para a superfície do aço exposta ao meio contendo glutaraldeído foi possível notar a presença de um biofilme não homogêneo e trincado, com poucos aglomerados celulares. Após a remoção do biofilme foi

observada corrosão uniforme e localizada, neste caso também relacionadas com o crescimento prévio das BRS na superfície do metal, pois o glutaraldeído aplicado para esta condição de ensaio pareceu não agredir muito a superfície, não sendo observada uma corrosão intensa devido à adição deste biocida.

Os ensaios eletroquímicos de EIE e polarização potenciodinâmica evidenciaram que o óleo de alho não evitou que o processo corrosivo continuasse ocorrendo, enquanto que o glutaraldeído, por ter apresentado uma alta redução das BRS sésseis, evitou que o processo corrosivo fosse acelerado.

Assim, apenas o glutaraldeído mostrou ser útil para o decréscimo das células sésseis e redução da CMI, ao ser aplicado por um tempo de 24 h após a formação do biofilme. Embora o óleo de alho também consiga reduzir as células sésseis, isso ocorre em proporção muito menor que o glutaraldeído. Além disso, esse biocida favorece a formação de um filme mais condutor na superfície do aço, contribuindo para acelerar a corrosão.

Referências bibliográficas

- (1). LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. An overview of microbiologically influenced corrosion. **Electrochimica acta**, v.37, n. 12, p. 2185-2194, 1992.
- (2). VIDELA, H.A.; CHARACKLIS, W.G. Biofouling and microbially influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.29, n. 3, p. 195-212, 1992.
- (3). VIDELA, H.A., Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais. 2003, São Paulo.
- (4). CLOETE, T.E.; JACOBS, L.; BRÖZEL, V.S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, v.9, n. 1, p. 23-37, 1998.
- (5). BHOLA, S.M.; ALABBAS, F.M.; BHOLA, R.; SPEAR, J.R.; MISHRA, B.; OLSON, D.L.; KAKPOVIA, A.E. Neem extract as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: A preliminary investigation. **Engineering Failure Analysis**, v.36, n. p. 92-103, 2014.
- (6). KORENBLUM, E.; DE VASCONCELOS GOULART, F.R.; DE ALMEIDA RODRIGUES, I.; ABREU, F.; LINS, U.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; VALONI, É.; SEBASTIÁN, G.V.; ALVIANO, D.S. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB express**, v.3, n. 1, p. 1-8, 2013.
- (7). BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **LWT-Food Science and Technology**, v.37, n. 2, p. 263-268, 2004.
- (8). CAÑIZARES, P.; GRACIA, I.; GÓMEZ, L.A.; DE ARGILA, C.M.; BOIXEDA, D.; GARCÍA, A.; DE RAFAEL, L. Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnology progress**, v.20, n. 1, p. 397-401, 2004.
- (9). ZALEPUGIN, D.Y.; TILKUNOVA, N.; YASHIN, Y.S.; CHERNYSHOVA, I.; MISHIN, V.; MULYUKIN, A. Application of supercritical fluid extraction to the development of new potential biocides on the basis of garlic (*Allium sativum* L.). **Russian Journal of Physical Chemistry B**, v.4, n. 7, p. 1103-1111, 2010.

- (10). PEREIRA, S.S.D.A.A.; PÊGAS, M.M.; FERNÁNDEZ, T.L.; MAGALHÃES, M.; SCHÖNTAG, T.G.; LAGO, D.C.; DE SENNA, L.F.; D'ELIA, E. Inhibitory action of aqueous garlic peel extract on the corrosion of carbon steel in HCl solution. **Corrosion Science**, v.65, n. p. 360-366, 2012.
- (11). AFIA, L.; BENALI, O.; SALGHI, R.; EBENSO, E.E.; JODEH, S.; ZOUGAGH, M.; HAMMOUTI, B. Steel corrosion inhibition by acid garlic essential oil as a green corrosion inhibitor and sorption behavior. **International Journal of Electrochemical Science**, v.9, n. 12, p. 8392-8406, 2014.
- (12). PAULA, M.S. **Avaliação da corrosão microbiológica do aço carbono 1020 em água do mar sintética na presença de bactérias redutoras de sulfato**. 2010. 105f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- (13). PAGNIN, S. **Formação de Biofilmes em Aço Superduplex UNS S32750 em Sistema Dinâmico**. 2008. 110f Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- (14). SILVA, F.B.A., R.S.; D'ELIA, E., Uso de Copaíba (Copaifera L) como inibidor da corrosão do aço-carbono 1020 em meio de cloreto, in XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro. 2007: Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- (15). PENNA, M.O. **Avaliação de bases ativas biocidas para controle de micro-organismos em sistemas de recuperação secundária de petróleo**. 2004. f Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- (16). HARRIS, A.; JONES, K.; LEWIS, J. An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v.231, n. 1, p. 21-30, 1998.
- (17). POSTGATE, J.R., The sulphate-reducing bacteria, ed. ED. 1984, Inglaterra: Cambridge University Press, Cambridge.
- (18). BEECH, I.; GAYLARDE, C.; SMITH, J.; GEESEY, G. Extracellular polysaccharides from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence of mild and stainless steel. **Applied microbiology and biotechnology**, v.35, n. 1, p. 65-71, 1991.
- (19). ZINKEVICH, V.; BOGDARINA, I.; KANG, H.; HILL, M.; TAPPER, R.; BEECH, I. Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. **International biodeterioration & biodegradation**, v.37, n. 3, p. 163-172, 1996.
- (20). PÉREZ, E.J.; CABRERA-SIERRA, R.; GONZÁLEZ, I.; RAMÍREZ-VIVES, F. Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. **Corrosion Science**, v.49, n. 9, p. 3580-3597, 2007.
- (21). BEECH, I.B.; SUNNER, J.A.; HIRAOKA, K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International microbiology**, v.8, n. 3, p. 157-168, 2005.
- (22). COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v.49, n. 1, p. 711-745, 1995.

-
- (23). VON RÈGE, H.; SAND, W. Evaluation of biocide efficacy by microcalorimetric determination of microbial activity in biofilms. **Journal of microbiological methods**, v.33, n. 3, p. 227-235, 1998.
- (24). SHENG, X.; TING, Y.-P.; PEHKONEN, S.O. Evaluation of an organic corrosion inhibitor on abiotic corrosion and microbiologically influenced corrosion of mild steel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.46, n. 22, p. 7117-7125, 2007.
- (25). 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, n. 3, p. 245-255, 2008.
- (26). ALABBAS, F.M.; WILLIAMSON, C.; BHOLA, S.M.; SPEAR, J.R.; OLSON, D.L.; MISHRA, B.; KAKPOVIA, A.E. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.78, n. p. 34-42, 2013.
- (27). CARVALHO, L.A.D.; ANDRADE, A.R.D.; BUENO, P.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quim. Nova**, v.29, n. 4, p. 796-804, 2006.
- (28). CASTANEDA, H.; BENETTON, X.D. SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. **Corrosion Science**, v.50, n. 4, p. 1169-1183, 2008.
- (29). BAYOUDH, S.; OTHMANE, A.; PONSONNET, L.; OUADA, H.B. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.318, n. 1, p. 291-300, 2008.