

ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MATERIAL COMPÓSITO

Aluna: Ellen Trindade dos Santos

Orientadores: Ivani Bott e Walter Cravo Jr

1. Introdução

As indústrias cujas estruturas são formadas por materiais metálicos, dentre elas a indústria aeronáutica, vêm sofrendo com a degradação dos seus materiais, devido à ação de micro-organismos formadores de biofilmes nas superfícies metálicas. Os tanques de estocagem de combustível de aviação (QAV) são um exemplo muito claro deste problema. Devido à susceptibilidade dos materiais metálicos ao fenômeno da biocorrosão, surge a necessidade do desenvolvimento de novos materiais que possuam uma resistência maior a formação de biofilmes e conseqüentemente aos fenômenos da biocorrosão.

A biodeterioração de material polimérico tem sido estudada por diversos autores. Vários fatores podem levar não só a mudanças nas características físicas dos materiais, mas também a perda de propriedades operacionais e uma diminuição nas características físico-mecânicas dos materiais poliméricos [1].

Estudos evidenciaram que para fins especiais, aditivos em produtos termoplásticos, ou seja, plastificantes, estabilizantes, cargas, corantes, etc, podem servir como fontes de alimentação para micro-organismos, além disso, pesquisadores alemães [1] observaram que o grau de deterioração depende dos comprimentos das cadeias de macromoléculas, isto é, poliestireno cloreto de polivinila, etc.

Para um melhor entendimento dos fenômenos da biocorrosão é necessário entender os mecanismos de adesão dos micro-organismos nas superfícies dos materiais (biofilme). O potencial de crescimento do biofilme foi testado para vários materiais [2]. O aumento da rugosidade e do caráter hidrofóbico aumentou o acúmulo de biofilmes em sistemas dinâmicos para os materiais poliméricos (PVC, PEX, HDPE e PP). Estes efeitos foram reduzidos em condições estacionárias.

O estudo da formação de biofilme nas superfícies de materiais poliméricos e os mecanismos inerentes a este processo são de extrema importância para uma melhor avaliação da deterioração a que estes materiais estão sujeitos nas diversas indústrias.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de formação de biofilmes em material polimérico como sendo uma alternativa para a substituição dos materiais metálicos atualmente utilizados na indústria aeronáutica.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Corrosão e Biofilme

A corrosão é um tipo de deterioração que pode ser facilmente encontrada em estruturas metálicas presentes em ambientes aquosos, ligeiramente úmidos e secos. Com os efeitos da corrosão, a liga metálica perde suas qualidades essenciais, tais como resistência mecânica, elasticidade, ductilidade, estética, etc. O controle e a prevenção são extremamente importantes, já que em alguns casos sua remoção torna-se impossível [3].

Existem vários tipos de corrosão, sendo a corrosão induzida por micro-organismo (CIM) uma importante fase nos tanques de estocagem, tendo como principais agentes as bactérias, tais como as BRS e as BANHT. Esses micro-organismos tendem a colonizar as superfícies sólidas, formando assim o biofilme (Figura 1), que é um encadeamento complexo de micro-organismos, contendo aproximadamente 95% de água em uma matriz de expolissacarídeos (EPS), que facilita a adesão de novas bactérias.

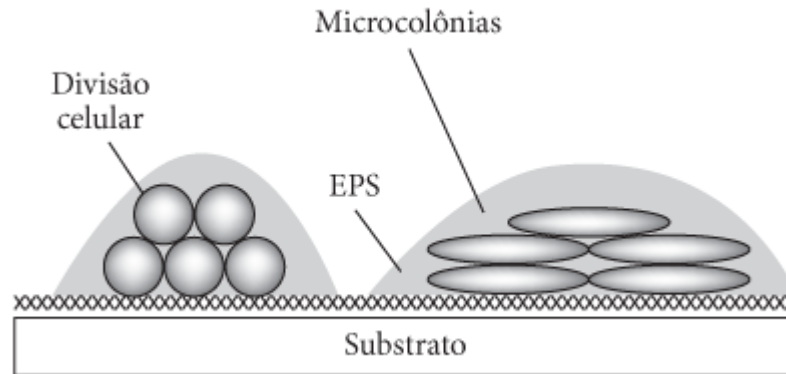


Figura 1 - Representação do biofilme.

A presença das células microbianas e dos compostos formados através de ações metabólicas acelera as reações eletroquímicas. As células absorvidas crescem na superfície metálica, reproduzem-se e formam colônias que modificam fisicamente a superfície do metal.

A ação conjunta dos micro-organismos que estão aderidos à superfície metálica, proporciona a ocorrência de processos combinados, que não ocorreriam pela ação apenas de um grupo microbiano [4].

Dentre os parâmetros que influenciam a biocorrosão estão: tempo de exposição, velocidade de escoamento, concentração de oxigênio dissolvido, disponibilidade de nutrientes, temperatura, características físicas da liga metálica, produtos de corrosão e composição da liga metálica.

Devido a todos estes problemas apresentados, surge a necessidade de se buscar alternativas que propiciem uma maior resistência aos processos de deterioração e conseqüentemente uma maior durabilidade das estruturas. Na pesquisa por materiais mais resistentes, surge a alternativa dos materiais de origem polimérica.

3.2. Material Polimérico

Polímero é uma substância macromolecular composta por unidades estruturais repetitivas que dão origem a longas cadeias (Figura 2), formadas principalmente por átomos de carbono.

Atualmente, os polímeros têm uma representação significativa em novas aplicações ou até mesmo substituindo materiais tradicionais como os metais. Comparando com os metais, os polímeros apresentam baixa densidade, baixa condutividade térmica e suas propriedades mecânicas são fortemente dependentes da temperatura.

Devido às características limitadas dos polímeros, como instabilidade aos agentes atmosféricos, baixa resistência mecânica e baixa resistência à temperatura, torna-se necessária a implementação de aditivos [5].

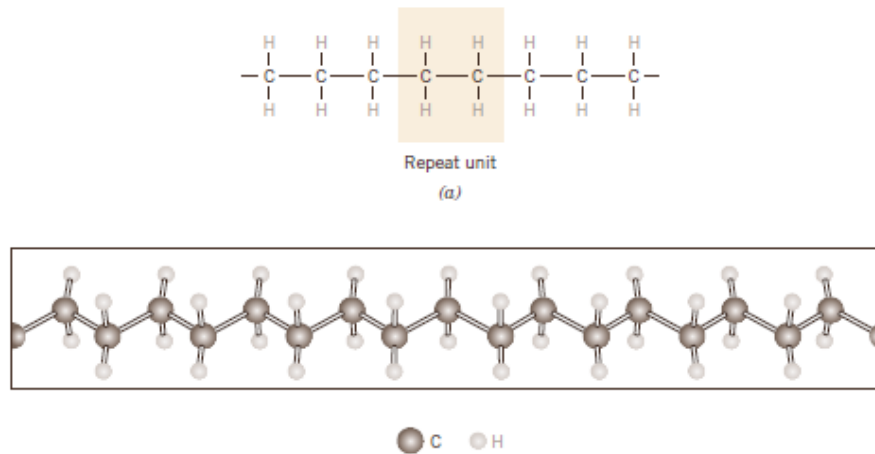


Figura 2 – Estrutura polimérica.

Dentre os diversos materiais não metálicos utilizados nas indústrias em geral, grande atenção tem sido dada as fibras de carbono. As fibras carbônicas ou fibras de carbono são matérias-primas que provém da pirólise de materiais carbonáceos que produzem filamentos de alta resistência mecânica usados para os mais diversos fins, entre estes motores de foguetões (naves espaciais). Durante o século XX foram desenvolvidos diversos materiais fibrosos de carbono e grafita. Estes têm desempenhado um papel importante no crescimento do desenvolvimento tecnológico humano. O carbono possui propriedades refratárias excepcionais, sua temperatura de vaporização chega aos 3.700°C, e sua resistência às modificações químicas e físicas é bastante grande mesmo em altas temperaturas [6].

A formação de biofilme, bem como a biodegradação são fenômenos que podem atingir o material polimérico, alterando propriedades físicas e químicas do polímero através da ação dos produtos do metabolismo de micro-organismos.

3.3. Querosene de aviação (QAV)

No processo de refino do petróleo, o QAV é obtido na faixa da coluna de destilação que opera entre 150°C e 300°C. É produzido por fracionamento do petróleo através de destilação à pressão atmosférica. Passa também por tratamentos e acabamentos a fim de eliminar os problemas advindos de compostos sulfurados, nitrogenados e oxigenados. Por ter elevado poder calorífico, resistência física e química a variações de temperatura e pressão e ter boas características lubrificantes, é adequado à geração de energia, por combustão, em motores turbinados de aeronaves. É fundamental que ele permaneça em estado líquido e homogêneo até a zona de combustão das aeronaves.

No Brasil, são produzidos dois tipos de querosene de aviação:

(I) QAV-1, de uso geral, com especificações alinhadas com as especificações do Jet A-1 da AFQRJOS (Aviation Fuel Quality Requirements for Jointly Operated Systems), conhecida como "Check List Jet A-1";

(II) Querosene de Aviação Especial para a Marinha do Brasil, também conhecido como JP5 ou combustível aeronaval, de uso específico [7].

O QAV é facilmente utilizado como fonte de carbono pela maioria dos micro-organismos. Ele possui em grande parte de sua composição moléculas de cadeia linear (n-alcenos) que são facilmente assimiláveis tornando este combustível facilmente biodegradável.

4. Materiais e Métodos

4.1. Material

Foram confeccionados por usinagem, para a realização dos experimentos de avaliação da formação de biofilme, corpos-de-prova em material polimérico constituído de fibra de carbono e resina epóxi, com as dimensões de 2,0 x 1,0cm.

A figura 3 apresenta a vista de topo do corpo-de-prova. As duas faces do material foram expostas ao fluido de processo, porém apenas uma das faces foi utilizada para avaliação do biofilme formado. Foi utilizada a face que fica em contato com o QAV nos tanques de estocagem. A área total considerada foi então de 2,0 cm². Foram confeccionados 14 corpos-de-prova.

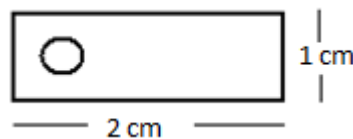


Figura 3 – Vista de topo do corpo-de-prova.

4.2. Grupos microbianos

Foram estudados dois grupos microbianos que normalmente estão presentes nos sistemas de exploração e produção de petróleo. Estes grupos são responsáveis em grande parte pela formação de biofilmes nas estruturas metálicas e conseqüentemente são indutores e aceleradores dos processos de biocorrosão nestas estruturas. Como são micro-organismos anaeróbios, podem estar presentes na base dos biofilmes formados nos tanques de estocagem de QAV, onde a difusão do oxigênio é dificultada. Foram avaliadas culturas mistas de bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT) e bactérias redutoras de sulfato (BRS). A tabela 1 apresenta as origens dos grupos microbianos avaliados:

Tabela 1 – Origem dos grupos microbianos.

Grupo microbiano	Origem
Bactérias anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)	Água do mar coletada na praia da Barra da Tijuca - RJ
Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	Água do mar coletada na praia da Barra da Tijuca - RJ

4.3. Adaptação dos grupos microbianos ao QAV

As amostras de água do mar foram coletadas assepticamente em frascos estéreis e levadas ao laboratório de biocorrosão para serem processadas. Antes do início do experimento de avaliação da formação de biofilmes nas superfícies do material polimérico realizou-se a etapa de adaptação das culturas microbianas (BANHT e BRS) ao QAV. Para tal finalidade foram realizados repiques sucessivos em meios de cultura apropriados para o crescimento dos grupos microbianos estudados. Foi realizado um aumento gradativo da concentração de QAV em substituição as fontes de carbono que fazem parte da composição destes meios de cultura. Para as BRS, no meio Postgate-E modificado foi realizada a substituição do componente

lactato de sódio por QAV e para as BANHT foi realizada a substituição do componente glicose por QAV. Ao final do processo de adaptação os meios de cultura apresentaram 50% v/v de QAV para ambos os meios. As tabelas 2 e 3 apresentam as composições dos meios de cultura utilizados.

Tabela 2 – Meio Postgate E modificado para bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS).

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	Água destilada	1 000 ml
2	Agar-ágar	1,9 g
3	KH_2PO_4	0,5 g
4	Na_2SO_4	1,0 g
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,608 g
6	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,83 g
7	Extrato de levedura	1,0 g
8	Ácido ascórbico	0,1000 g
9	Lactato de sódio 50% m/v	7,0 ml
10	Solução de resazurina 0,025% m/v	4,0 ml
11	NaCl	5,0 g
12	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
13	NH_4Cl	1,0 g

O meio Postgate – E modificado é o meio nutritivo usado para a seleção de culturas de BRS e também para a contagem de populações [8]. Esse meio deve ser incubado em anaerobiose. O sal de ferro, na concentração de 0,5% é usado com propósito de diagnóstico. A formação de um precipitado preto de FeS , escurecendo o meio, evidencia a redução bacteriana de sulfato. A adição de Agar na quantidade de 1,9 g/l para a formação de meio semi-sólido foi baseada na indicação de para facilitar o processo de adesão. A resazurina foi introduzida como indicadora de anaerobiose.

O preparo do meio é realizado cozinhando-se o Agar em água do mar sintética, sob agitação, até que ele esteja completamente dissolvido, quando então o aquecimento é desligado, mantendo-se agitação, e os componentes restantes são adicionados. O pH é ajustado para 7,6 com uso de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. O meio recebe purga de nitrogênio durante todo o preparo e o estado de anaerobiose é detectado pela mudança de cor da resazurina, de cor azul para róseo. Ao final, é acondicionado em vidros de 10mL ou 50mL. Os vidros recebem uma tampa de borracha e lacre de alumínio. A esterilização é feita em autoclave durante 15 minutos após atingir a temperatura de 121° C. Após a esterilização, parte do ágar apresenta-se em forma de flocos e o meio apresenta-se incolor ou róseo.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT).

Ordem de adição do reagente	Reagentes	Quantidades
1	Água destilada	1000 ml
2	Glicose	5,0 g
3	Peptona universal	4,0 g
4	Extrato de levedura	1,0 g

O meio de cultura foi preparado sob purga de nitrogênio para obtenção das condições de anaerobiose, o pH foi ajustado para 7,6. Ao final, foi acondicionado em frascos do tipo penicilina de 10mL. Os vidros recebem uma tampa de borracha e lacre de alumínio. A esterilização foi feita em autoclave durante 15 minutos após atingir a temperatura de 121° C.

Para a realização das diluições durante o processo de inoculação das culturas estudadas, utilizou-se uma solução padrão para estes grupos microbianos. A tabela 4 apresenta a composição da solução redutora.

Tabela 4 – Composição da solução redutora.

Reagentes	Quantidade
Trioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Solução de resazurina de 0,025% (m/v)	4 ml
Água do mar sintética	1 000 ml

O preparo da solução redutora foi realizado sob purga de nitrogênio. O pH foi corrigido ao valor de 7,8. Posteriormente o meio foi distribuído em frascos tipo antibiótico, tampados e selados. Foram então esterilizados por 15 minutos a 121°C.

4.4. Fluido de processo

Para a realização de todo experimento foram utilizados como fluidos de processo os meios de cultura para crescimento dos dois grupos bacterianos estudados. As composições destes fluidos estão apresentadas nas tabelas 2 e 3 deste relatório, substituindo as fontes de carbono pelo QAV como já descrito (item 4.3).

O combustível de aviação (QAV) utilizado foi cedido pela Petrobras.

4.5. Experimento

Esta simulação foi realizada com a finalidade de avaliar a formação de biofilmes em condições estáticas de fluxo e simular as condições de formação de biofilme em tanques de estocagem de QAV. Nos testes foram utilizados frascos tipo antibiótico (Figura 4), contendo 50mL de fluido e para cada ponto de estudo cinético foram utilizados frascos individuais.



Figura 4 – Sistema estático.

Realizou-se uma cinética de formação de biofilme. Nos frascos de 50mL foram colocados 25mL de QAV, 15mL de cultura e 10mL de meio de cultura, posteriormente os cupons foram imersos e o conjunto foi colocado em estufa bacteriológica para a incubação. Nos períodos de zero, 72, 216, 384, 672 e 840 horas foram retiradas alíquotas dos fluidos e corpos-de-prova para quantificação dos micro-organismos planctônicos e sésseis respectivamente.

Para a obtenção das bactérias sésseis, efetuamos a raspagem em solução redutora. A figura 5 ilustra o procedimento.



Figura 5 - Raspagem do cupom.

Após a raspagem os biofilmes foram ressuspensos em solução redutora para posterior inoculação nos meios de cultura específicos para cada grupo microbiano.

A manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.

Realizou-se a técnica das diluições sucessivas, para a obtenção do número mais provável (NMP) tanto para os micro-organismos planctônicos quanto sésseis.



Figura 6 - Inoculação nos kits.

Após 28 dias de incubação realizou-se a contagem dos dois grupos bacterianos estudados.

4.6. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por MEV foram realizadas nos cupons retirados do sistema estático. Após a retirada do sistema, os cupons foram submetidos ao protocolo de preparo descrito a seguir:

Protocolo – os cupons retirados do sistema eram colocados em solução de glutaraldeído 5% em tampão de cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente por 3 horas, e em seguida, dessalinizados e parcialmente desidratados. A dessalinização consistiu em lavagens sucessivas em soluções contendo água do mar sintética esterilizada e água destilada também estéril em diferentes proporções, começando da solução mais concentrada (30% de água destilada até chegar a 100% de água destilada). Para a etapa de desidratação mergulha-se a amostra em diversas soluções apresentando concentrações crescentes de acetona em água destilada entre 30% v/v e 100% v/v.



A



B

Figura 7.a - Bateria de dessalinização.

Figura 7.b - Bateria de desidratação.

Após esta primeira etapa, a secagem da amostra foi concluída no aparelho de Ponto Crítico modelo CPD-030 do fabricante Balzers.



Figura 8 - Aparelho de ponto crítico.

Após estes procedimentos as amostras foram encaminhadas para metalização com ouro (Au) no equipamento Sputter Coater Bal-Tec SCD 005 com alvos de ouro (Au) e com Carbon Evaporation Supply Bal-Tec CEA 035.



Figura 9 - Metalizador.

Posteriormente, foi realizada análise de MEV utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI Quanta 400, com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II, de resolução de 133 eV para 5,9 keV e software para operação automática inclusive do MEV.

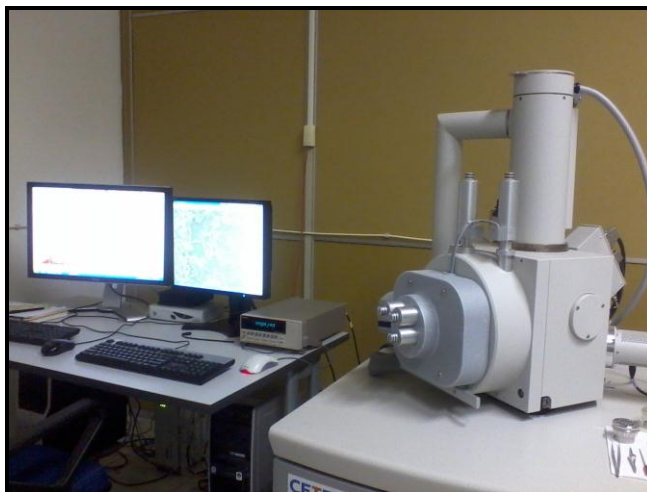


Figura 10 - Microscópio Eletrônico de Varredura.

5. Resultados

Após vinte e oito (28) dias de incubação, fez-se a contagem do número mais provável (NMP/mL) de células viáveis dos grupos microbianos estudados. As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os resultados obtidos. Convém salientar que as análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se a mediana para cada ponto amostrado. A partir dos resultados, construiu-se os gráficos da evolução cinética que são apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14.

Tabela 5 – Concentração de BANHT planctônica.

	0h	72h	216h	384h	672h	840h
Mediana	4.30E+04	1.40E+07	1.10E+07	1.40E+07	2.10E+05	4.60E+06
Resultado 1	9.30E+05	1.40E+07	4.60E+06	1.10E+07	2.10E+05	4.60E+06
Resultado 2	4.30E+04	1.10E+07	1.10E+07	1.40E+07	3.60E+05	4.60E+06
Resultado 3	2.80E+04	1.40E+07	1.10E+07	1.40E+07	3.60E+04	1.50E+06

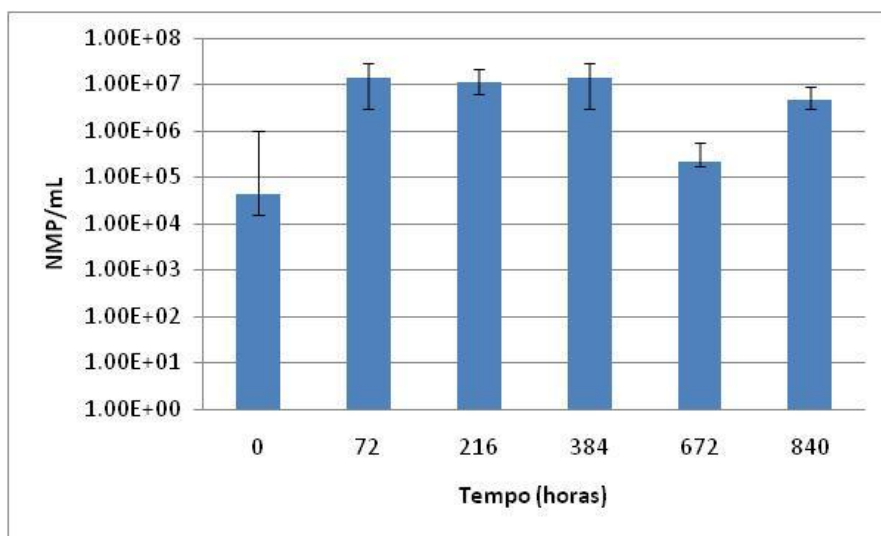


Figura 11 – BANHT planctônica.

Para as BANHT planctônicas pode-se observar um aumento de concentração nas primeiras 72 horas de processo, mantendo-se constante até o período de 384 horas, quando ocorre um decaimento do número de células viáveis.

Tabela 6 – Concentração de BANHT séssil.

	0h	72h	216h	384h	672h	840h
Mediana	3.80E+04	1.90E+06	8.40E+04	2.10E+05	8.40E+04	2.50E+05
Resultado 1	1.30E+04	3.90E+06	8.40E+04	1.90E+05	3.90E+05	2.10E+06
Resultado 2	3.80E+04	1.90E+06	6.70E+04	2.10E+05	3.90E+02	2.50E+05
Resultado 3	3.80E+04	8.40E+05	8.40E+04	3.80E+05	8.40E+04	8.40E+04

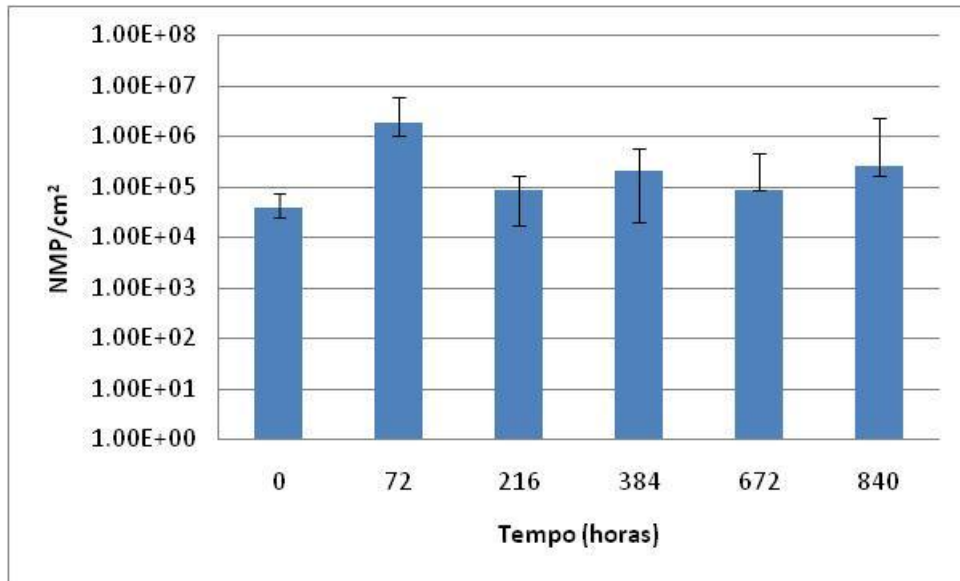


Figura 12 – Evolução do crescimento de BANHT sésseis.

Para as BANHT sésseis, observou-se que a concentração de células diminuiu logo após o período de 72 horas, o que não se verificou nas planctônicas.

Tabela 7 – Concentração de BRS planctônica.

	0h	72h	216h	384h	672h	840h
Mediana	9.30E+05	1.40E+07	1.40E+07	9.30E+05	2.30E+05	9.30E+05
Resultado 1	2.40E+06	1.40E+07	4.60E+06	4.30E+05	2.30E+05	2.30E+03
Resultado 2	2.30E+05	1.40E+07	1.40E+07	9.30E+05	2.30E+05	1.50E+06
Resultado 3	9.30E+05	1.40E+07	1.40E+07	2.40E+06	9.30E+05	9.30E+05

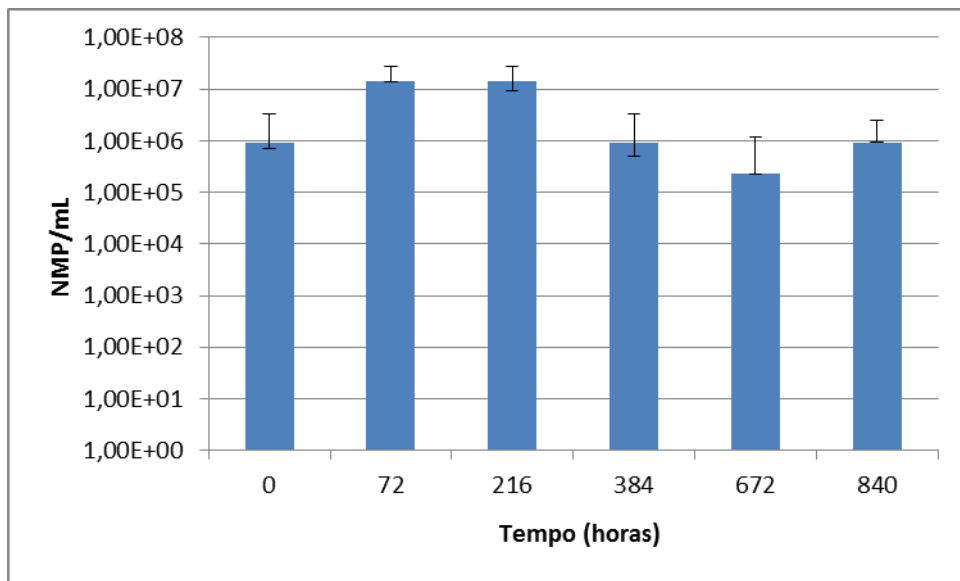


Figura 13 – Evolução do crescimento de BRS planctônica.

Para as BRS planctônicas, verificou-se comportamento semelhante. Para este grupo a diminuição da concentração celular ocorreu com 384 horas diferentemente das BANHT planctônicas. Este grupo bacteriano necessita de condições mais específicas para manutenção da viabilidade celular.

Tabela 8 – Concentração de BRS séssil.

	0h	72h	216h	384h	672h	840h
Mediana	3.90E+02	2.10E+06	8.40E+04	3.90E+04	3.90E+04	8.40E+03
Resultado 1	3.90E+02	3.90E+05	8.40E+04	8.40E+04	2.10E+04	2.10E+04
Resultado 2	1.30E+03	8.40E+06	6.70E+04	3.90E+04	3.90E+04	8.40E+03
Resultado 3	3.90E+02	2.10E+06	8.40E+04	2.10E+04	8.40E+04	8.40E+03

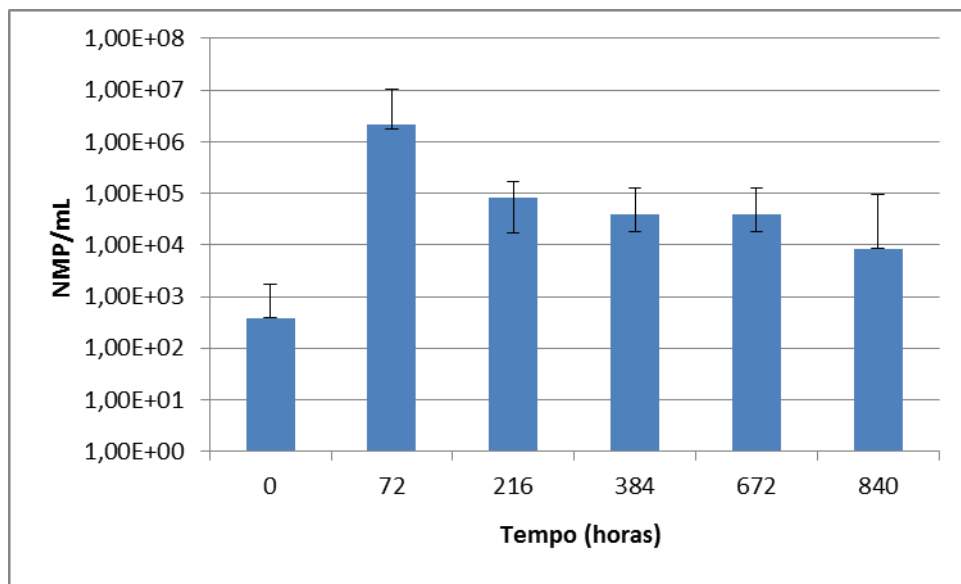


Figura 14 – Evolução do crescimento de BRS séssil.

Para as BRS sésseis ficou mais evidenciado que para o tempo de 72 horas houve uma maior concentração celular, sendo evidenciada uma queda gradativa da concentração a partir deste período.

De modo geral as análises quantitativas dos grupos bacterianos estudados revelaram uma crescente evolução dos biofilmes formados ao longo do tempo de exposição aos fluidos contendo o QAV até 72 horas, sendo este o período de maior adesão. O material polimérico estudado possibilitou a adesão dos dois grupos estudados e possibilitou, nas condições estáticas testadas, a permanência das células fixadas ao longo do período do experimento.

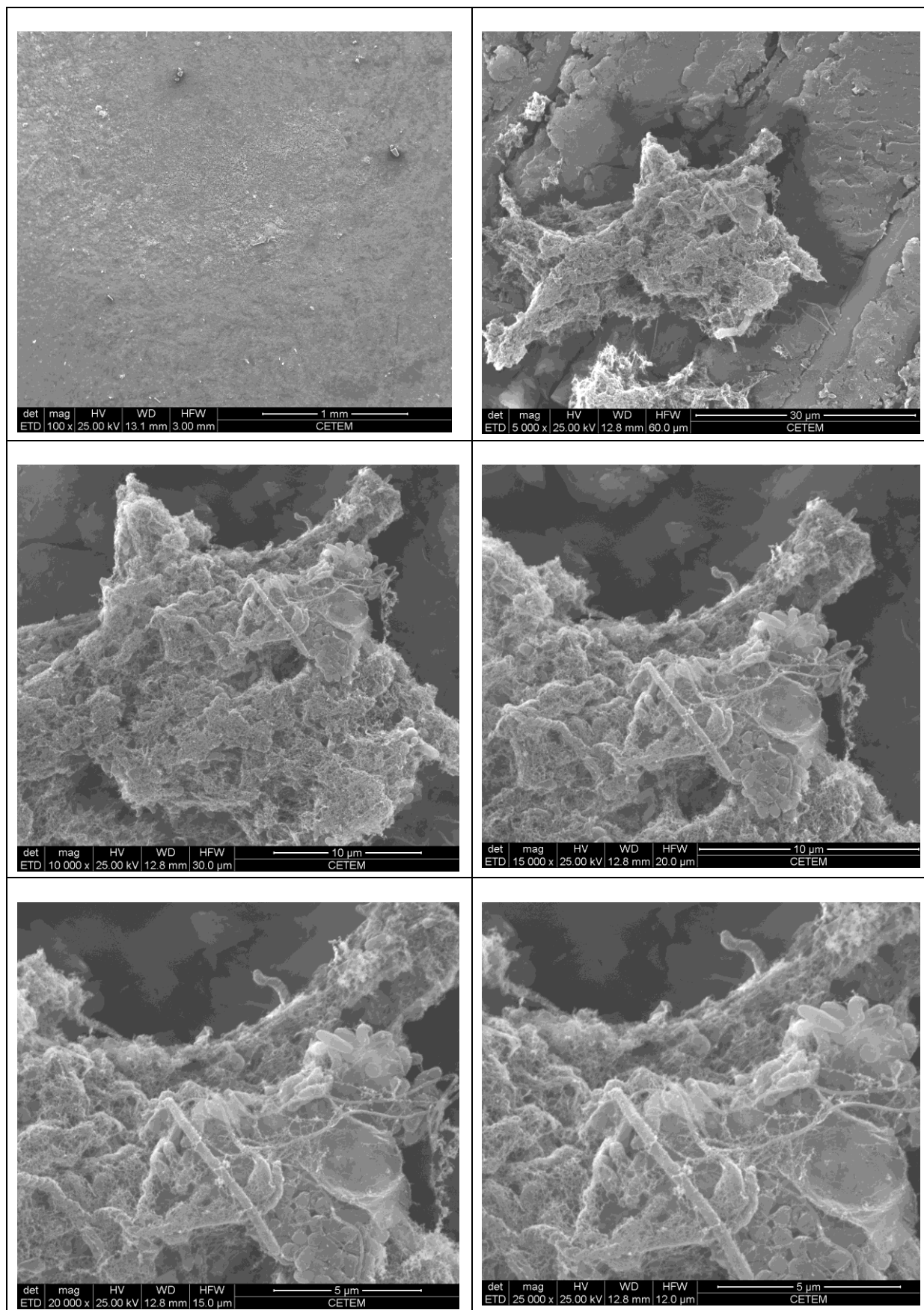


Figura 15 – Imagem de biofilme para a cultura mista de BANHT.

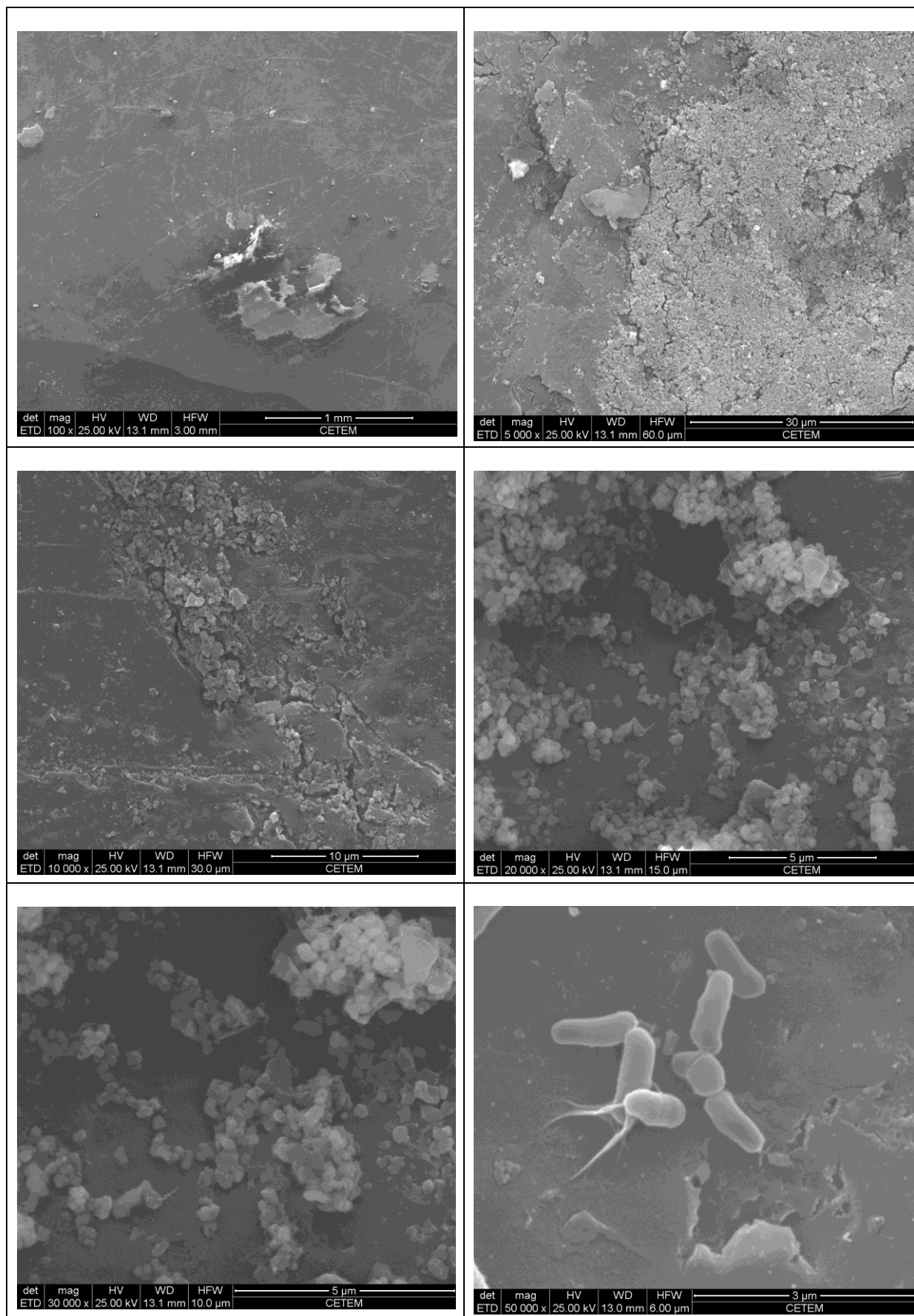


Figura 16 – Imagem de biofilme para a cultura mista de BRS.

Pelas imagens obtidas, verifica-se grande quantidade de material polimérico extracelular para os biofilmes formados pelos dois grupos microbianos. As imagens evidenciam uma variedade morfológica para as bactérias estudadas. Podemos perceber um maior número de células aderidas para o grupo das BANHT comparado com o grupo das BRS, corroborando os resultados das análises quantitativas. Além dessas observações destacamos que as células visualizadas apresentam um aspecto morfológico que caracteriza plena atividade metabólica demonstrando assim compatibilidade com o QAV como única fonte de carbono.

6. Conclusão

Pelos resultados obtidos observou-se que os grupos microbianos estudados apresentam boa adesão à superfície do material compósito promovendo a formação de um biofilme denso com produção de material polimérico extracelular. Estes resultados nos levam a concluir que o material estudado não inibe a formação de biofilme nas condições estudadas.

7. Referências

- 1 - V. D. Skorokhodov and S. I. Shestakova Protection of Nonmetal Construction Materials from Biological Corrosion: A Tutorial (Vysshaya Shkola, Moscow, 2004) [in Russian].
- 2 - DUARTE MANUEL, C. M. Biofilm Dynamics and Drinking Water Stability: Effects of Hydrodynamics and Surface Materials. Porto, 2007. Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering, Porto University.
- 3 - <http://www.cesec.ufpr.br/metallica/patologias/corrosao/corrosao-texto.htm>. Acesso em: 06 jul. 2011.
- 4 - LITTLE, Wagner e Mansfeld, 1992.
- 5 - <http://educa.fc.up.pt/ficheiros/noticias/69/documentos/108/Manual%20Pol%20A1meros%20Materiais%20polimericos%20NV.pdf>. Acesso em: 06 jul. 2011.
- 6 - http://pt.wikipedia.org/wiki/Fibra_de_carbono. Acesso em: 10 jul. 2011.
- 7 - http://www.br.com.br/wps/portal/!ut/p/c0/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQ3cXc_2CbEdFAAQ34A0!/?PC_7_9O1ONKG100MAF02LLTRPQ430Q4_WCM_CONTEXT=/wps/wcm/connect/portal+de+conteudo/Produtos/Para+Aviacao/QueroseneAviacao/. Acesso em: 10 jul. 2011.
- 8 - POSTGATE, J. R. (1984). Em: The sulphate-reducing bacteria. Cambridge. University Press, Cambridge.