

4

Materiais e métodos

4.1

Material

Foram confeccionados cupons de teste em aço inoxidável austenítico AISI 316 e superduplex S32750 a partir de chapa de 300 mm x 300 mm de área e barra de cerca de 25,4 mm de espessura, respectivamente. O processo de fabricação foi através da usinagem, de ambos os cupons. Estes apresentam vista de topo circular de diâmetro igual a 8,0 mm e vista lateral com altura de 3,0 mm (Figura 12). A área superficial inicial dos cupons, exposta ao fluido de teste, foi de 0,5 cm². Há uma redução do diâmetro inferior do cupom, que resulta na formação de ângulo de 5°C. Foram confeccionadas trinta unidades de cada cupom.

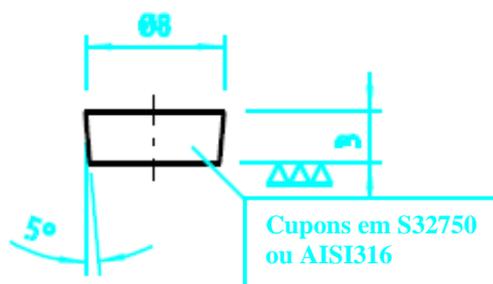


Figura 12 – vista lateral do cupom de prova (dimensões em milímetros).

A composição química, em fração em massa percentual, dos aços utilizados está na tabela 4. A diferença no balanço de massa representa o percentual de ferro.

Tabela 4 – Composição química dos aços inoxidável austenítico AISI 316 e superduplex S32750.

Número UNS	Nome	Composição (%)							
		Cr	Ni	C	Mn	Si	P	S	outros
S31600	316	16-18	10-14	0,08	2,0	1,0	0,045	0,030	Mo 2-3
S32750	SAF 2507	24-26	6-8	0,03	1,2	0,8	0,035	0,020	N 0,24- 0,32, Mo 3-5

Os corpos de prova foram submetidos a diferentes tratamentos superficiais a fim de obter perfis de rugosidade diferenciados. Parte dos cupons foi jateado com microesfera de vidro em equipamento Poloar, cabine pp 50. Outros cupons foram submetidos a polimento com pasta de diamante. Um grupo com partículas de diâmetro igual a 6 μm e outro com partículas de 1 μm .

4.2

Fluido de processo e meio de cultura

Conforme anteriormente descrito, o agente microbiológico escolhido para o desenvolvimento do presente trabalho foi o grupo de bactérias conhecido como bactérias redutoras de sulfato (BRS), cujo grupo é composto de diferentes espécies. As BRS foram isoladas a partir de amostra de óleo produzido na Bacia de Campos, estado do Rio de Janeiro.

O fluido de escoamento selecionado na aplicação dos ensaios foi à água do mar sintética. Esta possibilita uma constância nas concentrações dos diferentes componentes. Os constituintes da água do mar sintética presentes foram os recomendados por Lyman e Fleming (1940) em Uhlig, H.H. (1948), acrescidos de $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e Na_2EDTA , discriminados conforme Tabela 5.

Na detecção e quantificação de BRS foram preparados o meio de cultura “Postgate” E modificado e a solução salina redutora, conforme as tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5 – Composição da água do mar sintética. Quantidade para a elaboração de 10,0 L.

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	NaF	0,03 g
2	SrCl ₂ . 6H ₂ O	0,20 g
3	H ₃ BO ₃	0,30 g
4	Na ₂ SO ₄	40,0 g
5	CaCl ₂	11,13 g
6	MgCl ₂ . 6H ₂ O	107,80 g
7	KBr	1,0 g
8	KCl	7,0 g
9	NaSiO ₃ . 9H ₂ O	0,2 g
10	Na ₂ EDTA	0,0089 g
11	NaCl	235,0g
12	NaHCO ₃	2,0 g

Tabela 6 – Composição do meio de cultura Postgate E modificado.

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	Água do mar sintética	1 000 ml
2	Agar-ágar	1,9 g
3	KH ₂ PO ₄	0,5 g
4	Na ₂ SO ₄	1,0 g
5	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,608 g
6	MgCl ₂ . 6H ₂ 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	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
13	NH ₄ Cl	1,0 g

Tabela 7 – Composição da solução salina 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

Os preparos do meio e da solução salina redutora foram realizados sob purga de nitrogênio. O pH foi corrigido ao valor de 7,8 em ambos os casos. Posteriormente o meio foi distribuído em frascos tipo antibiótico (50 mL) e a solução salina em frascos de 10 mL, tampados e selados. Foram então esterilizados por 15 minutos a 121°C (1,1 kgf/cm²).

A salinidade do fluido de processo, do meio de cultura e da solução salina redutora foram corrigidas para 70,0 g/L de NaCl.

4.3

Ensaio

Para a realização do ensaio foi confeccionado um circuito de teste em polímero policloreto de vinila (PVC, em inglês), com bomba magnética, modelo MD-10, da Emerson de vazão máxima igual a 11,0 L/min ($1,83 \times 10^{-4}$ m³/s) com diâmetros nominais de sucção e de descarga iguais a 14mm. O circuito possui dois ramais em paralelo onde estão alocados oito dispositivos, também em PVC, conforme figura 11, que serão responsáveis pelo suporte dos corpos de prova, de modo que a face de maior área (face de teste) esteja posicionada tangencialmente à direção de escoamento do fluido de teste. O diâmetro interno das tubulações do circuito é de 18 mm. Há também um acessório, semelhante a um funil, utilizado como dispositivo de transferência de amostra. Nos dois principais ramais do circuito de teste estão alocados os dispositivos de suportação dos cupons de teste.

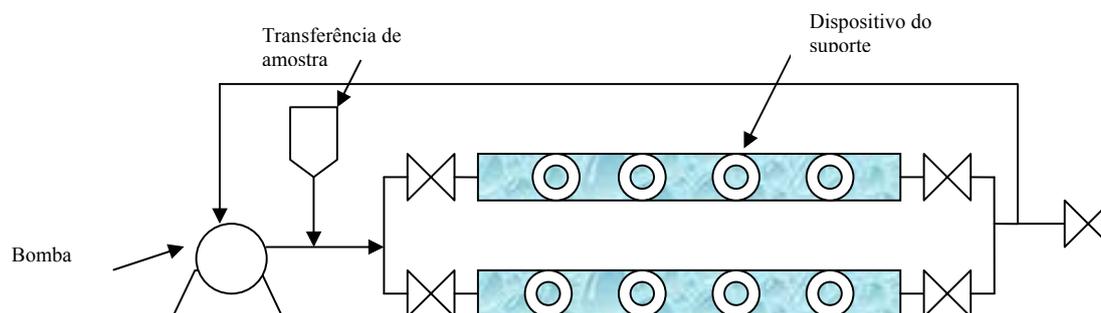


Figura 13 – esquema simplificado do circuito de teste.

O detalhe do dispositivo do suporte do cupom de teste pode ser visualizado na figura 14. Há um recipiente de transferência da amostra.

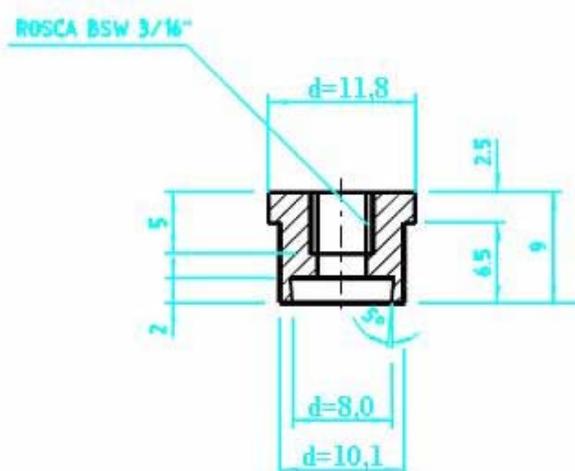


Figura 14 – vista do corte transversal do dispositivo de suportaçao do cupom de teste. As dimensões estao em milímetros.

O escoamento do fluido de teste possui um número de Reynolds, para uma vazão total de até $0,66 \text{ m}^3/\text{h}$ ($11\text{L}/\text{min}$), superior a 8000. Foram adotados os valores de massa específica, ρ , igual a $1\,020 \text{ kg}/\text{m}^3$, e viscosidade dinâmica, μ , igual a $7,69 \times 10^{-4}$. O escoamento é considerado turbulento para número de Reynolds acima de 4000.

Foram realizados ao longo deste trabalho cinco ensaios de teste. Os quatro primeiros testes envolveram a circulação de volume de $650,0 \text{ mL}$ de água do mar

sintética acrescido de 50,0 mL de inóculo de BRS. Os testes foram realizadas a temperatura ambiente e pH inicial de 6,8. Os tempos de ensaio e as ligas aplicadas em cada um estão descritas na tabela 9. Por último, foi realizada um quinto teste, cujos cupons de teste de S32750 e AISI 316 foram submetidos ao contato com a água do mar sintética, sem a inoculação da cultura mista de bactérias.

Tabela 9 – contagem de bactérias planctônicas no fluido de processo.

testes	Liga metálica	Número de dias de ensaio
1	S32750	15
2	AISI 316	15
3	S32750	35
4	AISI 316	35

Nas três primeiras corridas foram realizados ensaios de MEV e quantificação de bactérias. Nos cupons jateados e polidos com pasta de diamante de 1µm foram realizados ensaios de MFA antes da instalação no circuito e após 35 dias de corrida.

4.4

Detecção e quantificação de BRS

A detecção e a quantificação das BRS foi realizada no fluido de processo (bactérias planctônicas) e no biofilme aderido à superfície metálica (bactérias sésseis).

A manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada. Após cada inoculação, o frasco foi homogeneizado.

Para as bactérias planctônicas foi recolhida alíquota de cerca de 50,0 mL do fluido de processo, em frasco tipo antibiótico, após a realização de cada ensaio.

No caso das bactérias sésseis, o descolamento das bactérias sésseis aderidas à superfície metálica foi realizado através de ação mecânica por espátula de material polimérico para cada frasco contendo 9,0 mL de solução salina redutora com salinidade corrigida a 70 g/L de NaCl. Tanto do fluido (50 mL) quanto da solução salina contendo bactérias sésseis (9 mL), foi retirada uma alíquota de 5,0 mL para

frasco tipo antibiótico de 50,0 mL contendo 45,0 mL de meio de cultura “Postgate E” modificado. Este procedimento atende a análise de detecção. Em seguida, as bandejas foram incubadas em estufa a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante vinte e oito dias.

A leitura de resultado para a análise de detecção foi realizada diariamente, até o momento em que houve crescimento positivo, identificado pela formação de precipitado preto no meio de cultura. O mesmo procedimento foi adotado para a suspensão celular de bactérias sésseis. A classificação da atividade (detecção) atende a classificação da tabela 8.

Tabela 8 – atividade de bactérias planctônicas no fluido de processo no tempo zero (Gaylarde, C.C.; Videla, H.A., 1995).

Atividade	Número de dias, d
Baixa	$d \geq 14$
Média	$5 \leq d \leq 14$
Alta	$d \leq 5$

Para a quantificação de bactérias foi realizada a contagem do Número Mais Provável (NMP). Para tal, é realizada a técnica das diluições sucessivas, até a diluição de 10^{-8} .

4.5

Análise de sulfetos totais – Método colorimétrico do azul de metileno

As amostras foram coletadas em frascos contendo 0,2 mL de acetato de zinco para preservação e conservadas sob refrigeração até o momento da análise. Para as análises de sulfetos totais nos biofilmes, aderidos aos biocupons instalados no circuito de teste, estes foram retirados e alocados em frascos tipo penicilina contendo 10 mL de solução redutora.

O método colorimétrico do azul de metileno (N-1802, PETROBRAS) baseia-se na reação do sulfeto presente em fase aquosa com o ácido amino-sulfúrico, na presença de cloreto férrico, fornecendo uma coloração azul devido à formação do azul de metileno. A intensidade da cor, proporcional à concentração de sulfeto, é

medida por espectrofotometria. Por esta metodologia é analisada a concentração de sulfeto total da amostra, incluindo H_2S dissolvido, HS^- dissolvido e sulfetos metálicos do material em suspensão que sejam solúveis em meio ácido. O íon S^{2-} é desprezível constituindo menos de 5% dos sulfetos solúveis em pH igual a 12, e menos do que 0,05% em pH igual a 11.

Deve ser observado que determinados reagentes utilizados no procedimento de análise de sulfeto possuem baixa estabilidade havendo a necessidade de se refazer as soluções a cada 10 dias e, portanto, refazer também a curva de calibração. A curva de calibração fornece uma correlação linear entre intensidade da cor (lida no espectrofotômetro) e concentração de sulfeto obtida utilizando-se o método colorimétrico. O cálculo da concentração de sulfeto, em mg/L, foi obtido a partir da equação dada abaixo:

$$\text{Sulfeto}(\text{mg} / \text{L}) = \frac{L \times 250 \times 100}{V_a \times A}$$

onde:

L = leitura da concentração de sulfeto obtida na curva de calibração, em mg/L.

V_a = volume original da amostra, em mL.

A = alíquota para o desenvolvimento, em mL – sempre igual a 50mL neste trabalho.

4.6

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Energia Dispersiva de raios X (EDS)

As análises de MEV foram realizadas nos cupons inseridos no circuito de teste. Após a retirada do sistema, os cupons foram fixados por 3 horas em solução de glutaraldeído em tampão de cacodilato, 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. Após esta primeira etapa, a secagem da amostra foi concluída no aparelho de Ponto Crítico modelo CPD-030 do fabricante Balzers. Após estes procedimentos as amostras foram encaminhadas para metalização com prata (Ag) no equipamento Sputter Coater Bal-Tec SCD 005 com alvos de prata (Ag) e com Carbon Evaporation Supply Bal-Tec CEA 035. Posteriormente, foi realizada análise de MEV e EDS utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Leica S440, equipado com sistema de microanálise por dispersão de energia (EDS) Link ISIS L300 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. A metalização com a prata tem o objetivo de visualizar o enxofre presente na amostra através da análise de EDS, tendo em vista que outros metais, como o ouro, se superpõe ao pico do enxofre, impossibilitando a sua visualização.

4.7

Microscopia de Força Atômica (MFA)

A Microscopia de Força Atômica é uma ferramenta de análise superficial, criado em meados dos anos 80 por Binnig, Quate e Gerber, derivada da técnica de microscopia de varredura por tunelamento. Utiliza um cantiléver, haste flexível que funciona como uma mola, com uma ponta fabricado em Si_3N_4 amorfo ou Si cristalino. Ao aproximar o cantiléver da amostra, surgirão forças interatômicas repulsivas entre a ponta e a superfície que podem ser detectadas pela deflexão da mola. Esta deflexão, medida por um sensor óptico enquanto a ponta percorre a área que desejamos analisar, reflete a topografia da amostra.

As interações intermoleculares de van der Waals, atrativas ou repulsivas, são as forças responsáveis pela deflexão entre a superfície e a ponta do cantiléver.

A MFA pode ser operada, geralmente, em contato direto com a superfície, conhecido como modo de contato, ou na frequência de ressonância do cantiléver, conhecido como modo *Tapping* (Skolnik, A.M.; Hughes, W.C.; Augustine, B.H., 2000).

As medições e imagens obtidas por microscopia de força atômica foram realizadas a temperatura ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$), utilizando um microscópio de força atômica Dimension 3000, equipado com um controlador Nanoscope III e um módulo de extensão eletrônica (Veeco Instruments, Santa Bárbara, E.U.A.). Foi utilizada uma ponta triangular padrão de nitreto de silício, Si_3N_4 , de comprimento igual a $100\ \mu\text{m}$ e constante de elasticidade entre 0,03 e 0,5 N/m (NP-20 da Veeco Instruments). As imagens topográficas foram obtidas no modo contato. A área de varredura foi de $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$.

Uma das principais características, que faz da MFA uma técnica microscópica de destaque, é a caracterização de superfícies. Um método comum de avaliação de modificações na textura superficial é a chamada raiz quadrada do quadrado da média (RMS ou R_q) da rugosidade. O cálculo desta rugosidade é baseado na obtenção da mediana da amplitude da imagem e na avaliação do desvio padrão (Skolnik, A.M.; Hughes, W.C.; Augustine, B.H., 2000).

4.8

Análise por cromatografia de íons

A técnica de cromatografia de íons separa as espécies iônicas de interesse. Na cromatografia de íons, a separação é obtida quando os componentes da amostra são carregados pela fase móvel (ou eluente), migram e interagem com a fase estacionária. Os componentes que tiverem maior afinidade com a fase estacionária migrarão mais lentamente comparados aos de maior afinidade com a fase móvel.

Antes de cada análise, as amostras foram processadas do seguinte modo:

1) Passagem por um sistema de microfiltros MILLIPORE com membrana de porosidade $0,22\mu\text{m}$ com o objetivo de retirar material particulado e células microbianas existentes.

2) Para as amostras que continham íons em concentração muito mais alta que o íon de interesse, foi realizada a diluição da mesma.

3) Após a preparação acima descrita, injetou-se alíquota de 1mL no equipamento.

Os teores dos ânions de interesse foram determinados utilizando-se um cromatógrafo de íons da Metrohm de especificação 761Compact IC equipado com uma coluna de ânions de especificação Metrosep A SUPP 5 e um detetor condutimétrico 732 IC da Metrohm, sendo usada como fase móvel uma solução contendo 3,2mM/L de carbonato de sódio e 1,0 mM/L de bicarbonato de sódio a uma vazão de 0,70 mL/min. Foi instalado no referido equipamento um módulo de supressão química a fim de evitar um prévio processo de filtração para retenção de íons cloreto, que tendem a interferir na identificação e quantificação de outros analitos de interesse, além de minimizar os custos de cada análise. Como regenerante do sistema de supressão química foi utilizada uma solução 100 mM/L de ácido sulfúrico. Para as análises de ácidos orgânicos foi utilizado o mesmo equipamento equipado com uma coluna Metrosep Organic acids sendo usada como fase móvel uma solução 0,5 mM/L de ácido perclórico e como regenerante do sistema de supressão química uma solução 10 mM/L de cloreto de lítio.