

3. Revisão Bibliográfica

Este estudo avalia a formação de biofilme em sistemas dinâmico e estático utilizando fluido oleoso cujo efeito sobre a superfície metálica é a produção de corrosão. Assim sendo esta revisão bibliográfica irá abordar os diversos processos de corrosão, principalmente a corrosão influenciada por microrganismos e as características da formação do biofilme sobre a superfície metálica.

É importante mencionar que não há disponível na literatura, de acordo com a pesquisa realizada, estudos com sistemas dinâmicos utilizando altos teores de óleo, assim como também não há descrições de protocolos de preparação de amostras provenientes de meios oleosos para análise por microscopia eletrônica. Assim sendo, o estudo realizado nesta tese buscou analisar biofilmes formados em sistema dinâmico utilizando altos teores de óleo e desenvolver protocolos adequados para obtenção de uma boa visualização do biofilme obtido nestas condições.

3.1. CORROSÃO

A corrosão é um processo espontâneo de deterioração de um material, normalmente metálico, por ação química ou eletroquímica em ambientes aquosos ou úmidos associados ou não a esforços mecânicos. Este processo envolve reações eletroquímicas ou reações químicas heterogêneas na superfície de separação entre o metal e o meio corrosivo (GENTIL, 2003).

A maior parte dos fenômenos de corrosão são de natureza eletroquímica, havendo a existência de duas ou mais reações, ou seja, a oxidação de um metal (reação anódica) e a redução de um agente oxidante (reação catódica).

O processo de corrosão eletroquímica se baseia no transporte de elétrons, levando a formação de uma pilha. Este fenômeno é constituído de um processo anódico, onde há passagem de elétrons para a solução; deslocamento dos elétrons e íons, consistindo na transferência dos elétrons das regiões anódicas para catódicas e uma difusão de ânions e cátions na solução; e um processo catódico, onde há recepção de elétrons.

O processo de corrosão causa alterações indesejáveis no material original, como perda de massa, variações químicas ou modificações estruturais tornando-o inadequado ao uso, inicialmente destinado. Ligas metálicas estão presentes nas estruturas

enterradas, aéreas ou submersas, tais como oleodutos, gasodutos, cabos de comunicação e de energia elétrica, tanques de armazenamento de combustíveis, emissários submarinos, além de outros. Todas estas instalações representam grande investimento que exige durabilidade e resistência à corrosão.

O fenômeno da corrosão causa perda econômica direta, quando associado à manutenção e substituição de peças e indireta, quando relacionado, por exemplo, à paralisação de produção e contaminação de produtos, por exemplo, falhas por corrosão em tanques de armazenamento e dutos pode resultar em pequenos vazamentos, os quais causam contaminação atmosférica, de águas e de solos. A corrosão pode se desenvolver sobre a superfície do metal de diferentes formas, o presente estudo descreve estes tipos de corrosão dando uma abordagem mais significativa para a corrosão localizada induzida por microrganismo.

A corrosão foi agrupada, em oito tipos conforme a Figura 1: uniforme, galvânica, corrosão em frestas, corrosão por pites, corrosão intergranular, corrosão seletiva, corrosão erosão e corrosão sob tensão (Fontana 1987). Esta classificação envolve diferentes aspectos morfológicos e fenomenológicos, porém é amplamente aplicada.

A corrosão uniforme é a perda de material distribuída uniformemente pela espécie exposta ao ambiente corrosivo. Um exemplo de tal processo corrosivo é o observado nos metais em contato com ácidos fortes.

A corrosão galvânica resulta da formação de uma célula eletroquímica entre dois metais. Deste processo corrosivo deriva o conceito de nobreza eletroquímica comparativa entre os metais, onde é importante destacar que a corrosão do metal menos nobre é mais acentuada.

A corrosão por frestas é causada pela concentração diferenciada de oxigênio entre duas regiões do material que leva a uma pilha por aeração diferencial.

A corrosão por pites ocorre em metais passivos na presença de íons cloreto. Os íons cloreto rompem localizadamente a película passiva. Como as condições são de estagnação no interior do pite, forma-se aí uma solução ácida, o que possibilita um rápido crescimento do pite para o interior do material.

A corrosão intergranular é o ataque seletivo dos contornos de grão e geralmente está associado a tratamentos térmicos que conduzem a precipitações de fase nos contornos de grão.

A corrosão seletiva implica na dissolução seletiva de um dos componentes de uma liga presente em solução sólida. Este processo leva a formação de uma camada porosa do metal mais nobre.

A corrosão erosão é o resultado da reação eletroquímica combinada com uma perda de material por desgaste mecânico devido ao choque de sólidos ou fluidos.

A corrosão sob tensão se processa entre os grãos da rede cristalina do material metálico, o qual perde suas propriedades mecânicas e pode fraturar quando solicitado por esforços mecânicos (Gentil, 2003).

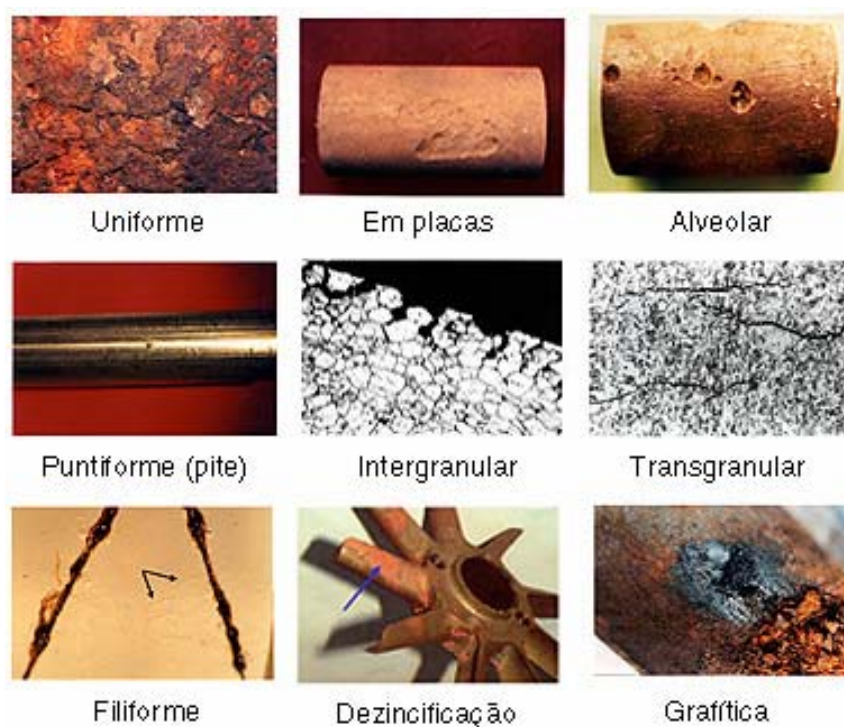


Figura 1 – Formas de corrosão (livro do Vicente Gentil, 2003)

3.1.1 CORROSÃO INDUZIDA POR MICRORGANISMOS (CIM)

A CIM ou biocorrosão é qualquer processo de corrosão localizada causada por modificações microbianas em uma superfície e ocorre normalmente associada a processos corrosivos abióticos, acelerando as taxas de corrosão (Sooknah, R. et al., 2008). Os produtos resultantes do metabolismo dos microrganismos presentes nos biofilmes são responsáveis por diferentes formas de corrosão, entre elas a corrosão por pites e corrosão por frestas.

O processo corrosivo em materiais metálicos pode ser induzido e acelerado com a presença de microrganismos, através de sua capacidade de provocar alterações quantitativas e qualitativas nos parâmetros físico-químicos e na interface metal/fluido. Este processo pode ocorrer tanto em ambientes anaeróbios como em aeróbios, causando no metal uma forma de corrosão localizada e estando por isso mais relacionada à corrosão por pites (puntiforme) e alvéolos (Ford e Mitchell, 1990; Ferris, e colaboradores, 1992). A corrosão microbiológica é um fenômeno eletroquímico cuja manifestação depende do substrato e das condições ambientais.

A biocorrosão em qualquer sistema é raramente ligada a um único mecanismo ou a uma única espécie bacteriana. Ao contrário, tanto os efeitos agressivos quanto os inibitórios que uma população bacteriana exerce nas reações de corrosão se devem tipicamente às interações biofilme-produto de corrosão na superfície do metal. Microrganismos sobrevivem em diversas superfícies principalmente em biofilmes formados em superfícies metálicas como alumínio, cobre, ferro e suas ligas. Bactérias associadas a materiais corroídos têm sido frequentemente agrupadas pela sua demanda metabólica por diferentes substratos aceptores de elétrons. As principais espécies de microrganismos predominantes a este tipo de substrato são bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias oxidantes do enxofre, bactérias oxi-redutoras do ferro, bactérias oxidantes do manganês e bactérias produtoras de ácidos (Sooknah, R. et al, 2008; Beech, 1999). Estes organismos co-existem, geralmente formando comunidades em biofilmes naturais.

Os microrganismos estão presentes na corrosão, pois estão relacionadas à formação de filmes sobre as superfícies metálicas, estas por sua vez são colonizadas por microrganismos, incluindo as bactérias que são geralmente os primeiros colonizadores (Sonak e Bhosle, 1995).

Os microrganismos produzem materiais metabólicos que apresentam ação corrosiva e uma vez excretados para o meio extracelular, se solubilizam na fase aquosa, o que permite um contato direto com o metal, potencializando, desta forma, o processo corrosivo na superfície metálica. Os produtos metabólicos microbianos que tendem a provocar perda de massa generalizada do metal são:

- Ácidos orgânicos e inorgânicos
- Dióxidos de carbono (CO₂)
- Gás sulfídrico (H₂S)

- Hidrogênio (H^+).

É importante mencionar que muitas espécies de microrganismos produzem metabólitos agressivos ou corrosivos ao metal, porém a presença desses microrganismos na superfície de um metal corroído não é evidência suficiente para indicar sua contribuição no processo corrosão (Ghassem e Adibi, 1995; Little e colaboradores, 1997a). Assim como não é possível relacionar o número de microrganismos detectados em um biofilme de uma região corroída à extensão da corrosão, deve-se levar em consideração o estado metabólico dos microrganismos (Little e Wagner, 1997b).

A corrosão causada por BRS em estruturas metálicas ferrosas (aço) ocorre tanto em ambientes terrestres como aquáticos. Esta corrosão ocorre a valores de pH neutro e é característico de ambientes anaeróbios ou áreas localizadas que acabam se tornando microambientes anaeróbios apropriados ao desenvolvimento das BRS (Obuekwe, 1990; Postgate, 1984).

A formação de biofilmes em superfícies metálicas associadas as BRS podem causar corrosão, sendo que em condições locais favoráveis de anaerobiose levam ao crescimento dessas bactérias e em sistemas industriais podem surgir na forma de consórcios microbianos mistos. Polímeros extracelulares sintetizados por diferentes cepas de BRS podem contribuir para o processo de corrosão, não somente por facilitar a adesão celular irreversível e conseqüente colonização em superfícies metálicas, mas também por suas características de ligação a íons metálicos (Cheung, 1995).

Nos processos de recuperação secundária de petróleo, a água do mar é obtida de fontes próximas à plataforma, sendo desaerada para prevenir a corrosão pelo oxigênio, tratada, filtrada e depois injetada para manter a pressão do reservatório. Estabelece-se, portanto, um ambiente interno favorável ao crescimento de microrganismo, principalmente as BRS devido à anaerobiose exigida. A presença de sulfato e nutrientes favorece o crescimento deste grupo bacteriano e a superfície metálica das linhas do sistema serve como substrato de adesão para essas bactérias.

A CIM é um fenômeno que acarreta inúmeros problemas na indústria do petróleo, provocando a deterioração de estruturas de aço, sistemas de resfriamento, sistemas de água de injeção, tanques de estocagem de óleo e cabos submersos em água (Hamilton, 1983).

BRS injetadas juntamente com a água do mar podem ser carregadas até o poço de petróleo. O crescimento destas bactérias pode ser estimulado por atividades associadas

com a recuperação do petróleo (revisto em Sebastián, 1999). Independente de sua origem, uma vez nos reservatórios produtores de petróleo, BRS podem causar inúmeros problemas, são eles: 1) BRS podem causar corrosão anaeróbia das tubulações metálicas que escoam o óleo desde a sua saída do reservatório até sua estocagem no continente; 2) o crescimento bacteriano pode resultar em uma redução na recuperação de óleo, devido ao tamponamento da porosidade da rocha-reservatório pela biomassa, e conseqüente perda de injetividade do poço de petróleo; 3) a produção de H_2S , resultado da redução de sulfato pelas BRS reduz, por acidificação (“souring”), a qualidade do óleo recuperado.

É importante ressaltar que, embora alguns poços de petróleo já apresentem produção de óleo com problema de “souring” desde o início da sua exploração, o fator mais significativo para indução e/ou agravamento deste problema em um reservatório de petróleo é a injeção de água. Ressalta-se também que, em geral, crescimento mais acentuado de BRS no sistema de recuperação de petróleo é detectado nas cabeças de poço injetor e de produção, coincidentemente locais mais afetados pela corrosão microbiológica.

3.2. BIOFILMES

Biofilme é constituído de uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por microrganismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água.

As células microbianas conseguem aderir firmemente a quase todas as superfícies imersas em solução aquosa. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo o conjunto a designação de biofilme.

3.2.1. Capacidade de adaptação das bactérias ao ambiente

Uma importante característica das bactérias é sua grande capacidade de crescimento rápido em ambientes e condições nutricionais favoráveis. Ainda mais interessante é a habilidade desses microrganismos sobreviver em condições adversas.

Durante um período de escassez de nutrientes muitas bactérias desenvolveram mecanismos altamente sofisticados que lhes permitem manter a viabilidade celular, voltando a crescer rapidamente quando estes se tornam disponíveis. Pode-se dizer que as bactérias se constituem na forma de vida terrena, em termos de biomassa total e em relação à variedade e extensão dos habitats colonizados, devido principalmente à plasticidade fenotípica, ou seja, à habilidade do genótipo bacteriano de responder fenotipicamente a estímulos ambientais. Uma importante estratégia fenotípica que vem sendo extensivamente estudada é a organização das bactérias sob a forma de biofilmes (Brown e Williams, 1985; revisto em Costerton e colaboradores, 1995).

Em ambientes aquáticos, as bactérias podem ser encontradas livremente em suspensão (existência planctônica) ou aderidas a um substrato inerte ou superfície viva (existência sésil). Organizações complexas de várias espécies e até gêneros diferentes podem ocorrer dentro de populações bacterianas planctônicas e sésseis. As condições ambientais, em grande parte, definem se os organismos irão existir em um estado planctônico ou sésil (Geesey, 1993).

As bactérias aderidas a superfícies sólidas formam uma camada que constitui os biofilmes bacterianos. Estes biofilmes estão presentes na maioria das superfícies molhadas ou úmidas, encontradas na natureza ou em ambientes industriais e médicos. Os biofilmes bacterianos podem atingir dimensões compatíveis à observação a olho nu. Essas comunidades microbianas podem ter sido as primeiras a serem estudadas na área da microbiologia. O físico alemão Robert Koch criou critérios experimentais que serviram como base para o estudo de microrganismos infecciosos e desenvolveu o primeiro método para o crescimento de culturas puras de microrganismos (Madigan e colaboradores, 2000). Entretanto, somente a partir da década de 70, o modo de existência sésil das bactérias sob a forma de biofilmes foi compreendido como sendo a principal forma de organização bacteriana na natureza (Geesey e colaboradores, 1977).

As BRS, principal grupo microbiano promotor da biocorrosão, por serem anaeróbias e terem sua nutrição relativamente restrita são normalmente encontradas como componentes de uma comunidade ou consórcios na forma de biofilmes, em interfaces ou sobre substratos sólidos, e este consórcios permitem a criação de micro-ambientes anaeróbios dentro de um ambiente aeróbio (Figura 2).

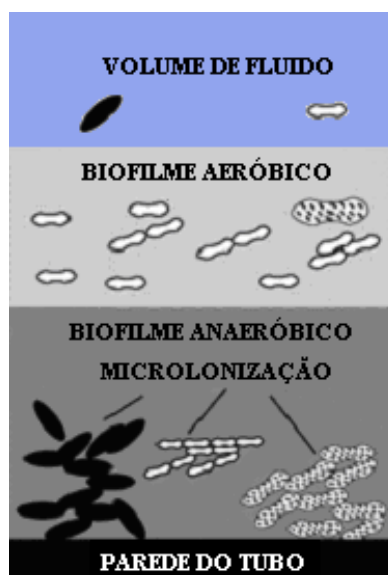


Figura 2 – Esquema da formação de um micro-ambiente anaeróbico em um biofilme de consórcio bacteriano. (Extraído de: <http://www.edstrom.com>)

Estudos mais recentes mostram que a adesão bacteriana ocorre de uma forma bastante organizada obedecendo a princípios de especificidade e sinalização celular (Zhang e colaboradores, 2002). Muitas bactérias se comunicam pela liberação de sinais químicos específicos (feromônios) que aumentam com o aumento da densidade da população bacteriana. É sugerido que as bactérias utilizem este tipo de sinal químico para induzir a expressão de genes alvo em particular, somente em populações muito grandes, fenômeno este conhecido como “quorum sensing” (sensibilidade à densidade). Esta descoberta pode ser de grande importância para uma intervenção humana nesta via de sinalização específica, pela prevenção da atividade de bactérias danosas à saúde, ao ambiente ou à indústria, ou pela estimulação da atividade de outros grupos de bactérias tornando-os competidores “benéficos” nos consórcios onde estão presentes.

3.2.2. Estrutura e fisiologia de biofilmes

Os biofilmes bacterianos são estruturas constituídas por comunidades de bactérias aderentes entre si e/ou a superfícies inertes ou vivas (existência sésil), envolvidas por matriz extracelular altamente hidratada. A superfície do biofilme é bastante adsorviva devido a sua natureza polieletrólítica, capaz de reter quantidades significantes de compostos orgânicos e inorgânicos do meio (Characklis, 1981; Nivens e colaboradores, 1995). Aproximadamente 80% - 90% da massa total dos biofilmes é constituída por

água. As bactérias representam cerca de 70% do peso seco, enquanto o restante é atribuído aos elementos de matriz extracelular (Marsh e Bradshaw, 1995).

Nos primeiros momentos da formação do biofilme, bactérias sésseis encontram-se justapostas podendo formar microcolônias de espécies simples ou mistas (Costerton e colaboradores, 1995). A microcolônia é a organização básica do biofilme em crescimento, podendo ser comparado ao tecido como organização fundamental na formação dos órgãos de organismos superiores. O ambiente interno de cada microcolônia é condicionado pelos elementos de matriz extracelular e pela atividade metabólica de suas células. Os biofilmes possuem um alto grau de organização, onde as bactérias se beneficiam da justaposição estável e da cooperatividade fisiológica para constituir uma comunidade funcional coordenada. Sabe-se, por exemplo, que essas populações microbianas aderidas se beneficiam dos nutrientes e são mais ativas metabolicamente do que as planctônicas (Ferris e colaboradores, 1989).

A arquitetura dos biofilmes é formada por estruturas cônicas simples e por outras em forma de cogumelo. Essas estruturas formam poros e canais de água, pelos quais circulam os nutrientes entre microcolônias (DeBeer e colaboradores, 1994; Stoodley e colaboradores, 1999). As células em diferentes regiões de um biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética (Davies e colaboradores, 1998).

A formação de biofilmes é uma estratégia bacteriana universal para sobrevivência e posicionamento favorável em relação aos nutrientes disponíveis (Costerton e colaboradores, 1987). Constitui, também, uma forma protegida de crescimento que permite a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis (Figura 3).

O modelo abaixo representado contempla aspectos estruturais e fisiológicos de um biofilme bacteriano aderido a uma superfície sólida. A figura mostra estruturas cônicas e em forma de cogumelo, perfuradas na sua extremidade inferior por canais pelos quais circulam fluidos e nutrientes. As bactérias organizam-se em microcolônias imersas em grande quantidade de matriz extracelular. Porções mais superficiais do biofilme se desprendem, com conseqüente limitação do crescimento do biofilme e colonização de novas regiões da superfície.

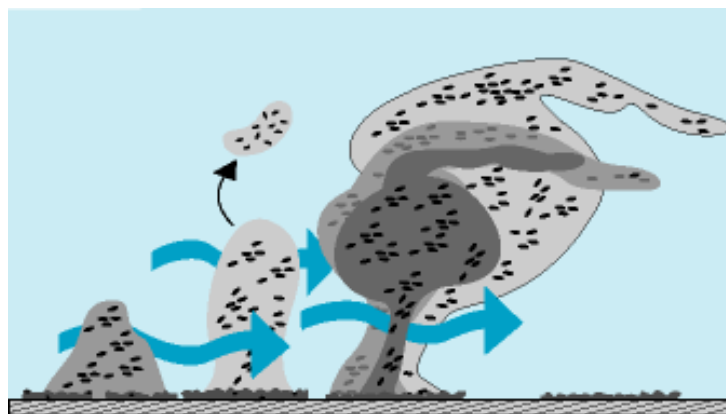


Figura 3 – Representação esquemática da estruturas do biofilme bacteriano (extraído de Costerton e colaboradores, 1999).

3.2.3. Fase inicial na formação de biofilme

A formação do biofilme se inicia a partir do momento em que um material inerte é colocado em contato com um ambiente líquido. A superfície sofre mudanças se iniciando a começar pela adsorção de compostos químicos inorgânicos. Em ambientes biologicamente ativos, há aderência de moléculas orgânicas (camada condicionante) e de bactérias, dando início ao processo de formação do biofilme bacteriano.

Entre a superfície e o meio aquoso é formada uma interface sólido-líquido que proporciona um ambiente ideal para a adesão e o crescimento de microrganismos. Uma visão clara desta adesão não pode ser obtida sem considerar os efeitos do substrato, filmes condicionantes formados no substrato, hidrodinâmica do meio aquoso, composição química do meio e várias propriedades da superfície celular.

Mittelman (1985) evidenciou a formação de uma camada orgânica na interface sólido líquido logo após o contato de uma superfície metálica (Figura 4). Este material orgânico é identificado como formador da “camada condicionante”, que neutraliza a energia livre e a carga de superfície que podem impedir a aproximação das células bacterianas a uma distância ideal para iniciar o processo de adesão. Estas moléculas orgânicas adsorvidas servem muitas vezes como fonte de nutrientes para as bactérias.

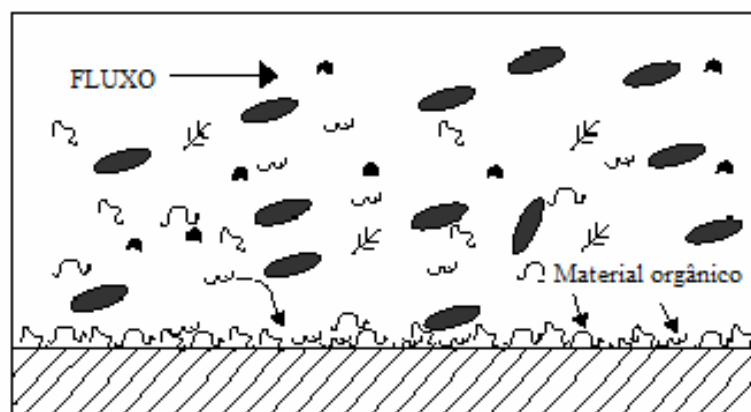


Figura 4 – Esquema de adsorção de moléculas orgânicas numa superfície limpa formando um filme condicionante. (Adaptado de <http://www.edstrom.com>)

Numa sequência de etapas as bactérias planctônicas irão se aproximar da superfície do metal tornando-se aprisionadas na camada limite, uma zona de pouca interferência, onde a velocidade do fluxo cai à zero (Figura 5). Por um período limitado de tempo algumas destas células irão se adsorver na superfície, soltando-se posteriormente. Este fenômeno é chamado de adesão reversível. Esta adesão inicial é devida a atração eletrostática e em forças físicas, não em fenômenos químicos, de forma que as bactérias se descolam da superfície com frequência. Algumas das células reversivelmente aderidas secretam moléculas que permitem sua adesão permanentemente à superfície. Estas células tornam-se então, irreversivelmente aderidas.

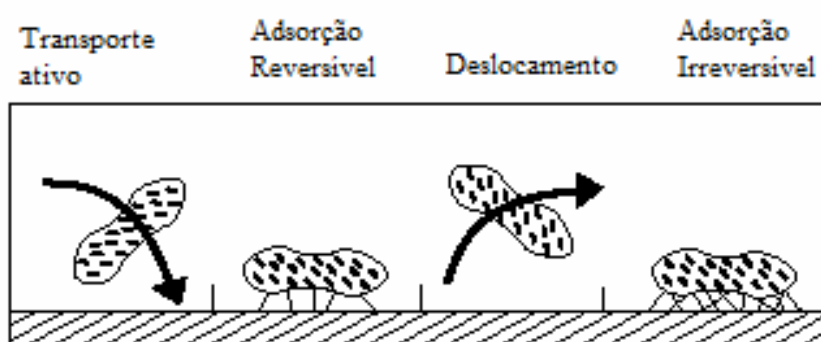


Figura 5 – Esquema representativo das etapas sequenciais de adesão de bactérias a um substrato sólido. (Adaptado de <http://www.edstrom.com>)

Segundo Mittelman (1985), a parede celular bacteriana se expande através dos polímeros extracelulares levando a adesão. Este material polimérico que forma o glicocálix consiste de grupos polissacarídeos carregados e neutros que não somente

facilitam a adesão, mas também atuam como um sistema de troca de íons para aprisionar e concentrar traços de nutrientes provenientes da água. O glicocálix presente na parede celular atua como uma camada protetora das células aderidas que ameniza os efeitos dos biocidas e outras substâncias tóxicas. Estes polímeros extracelulares, especialmente quando são secretados, recebem o nome de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) e seu papel nos processos de adesão bacteriana a superfícies será discutido com detalhes mais à frente.

Após a adesão irreversível das bactérias planctônicas e com o acúmulo de nutrientes, as células pioneiras começam a se dividir, o que resulta no estabelecimento de uma colônia de bactérias. As células-filhas produzem SPE, aumentando de forma considerável o volume das trocas iônicas na superfície. Além de imobilizar moléculas nutrientes, os SPE também aprisionam outros microrganismos através de interações eletrostáticas e contenção física.

De acordo com Borenstein (1994), outras bactérias se associam à superfície, em questão de dias, depois da colonização realizada pelas espécies pioneiras. Colonizadores secundários utilizam o produto metabólico dos colonizadores primários, ou produzem o seu próprio produto metabólico que, por sua vez, pode ser utilizado por outras células.

O biofilme bacteriano pode atingir dimensões macroscópicas através da aderência de outros microrganismos (algas, fungos e protozoários) e /ou de macrorganismos (cracas, mexilhões, etc.) adquirindo a denominação de “biofouling”. O termo “fouling” (incrustação, acumulação de resíduos, depósitos, sujeira, etc.) está relacionado à formação indesejável de depósitos orgânicos e/ou inorgânicos em superfície, podendo causar problemas como, por exemplo, diminuição do fluxo de calor através de uma superfície e o aumento de sua taxa de corrosão (Characklis, 1981).

O processo de formação de um biofilme bacteriano pode ser subdividido em vários estágios. Em resumo, é uma reação em cadeia, resultante dos seguintes processos físicos, químicos e biológicos:

1. Formação da camada condicionante por moléculas orgânicas que se transferem do líquido para a superfície sólida.
2. Colonização ou adesão da superfície por bactérias planctônicas e começo da existência sésil pela excreção de produtos de matriz extracelular, que ancoram as células à superfície de uma forma geralmente irreversível.
3. Replicação de diferentes espécies de bactérias sésseis sobre a superfície do metal.

4. Crescimento das microcolônias e eventual estabelecimento de relações próximas entre elas na superfície. Nesta fase, o biofilme aumenta em espessura e as condições em sua base são alteradas.
5. Desprendimento de porções do biofilme.
6. Recolonização de áreas adjacentes e expostas da superfície por bactérias planctônicas ou por bactérias sésseis.

Em biofilmes maduros, a maior parte do seu volume é ocupada pela matriz organizada do glicocálix (75% - 95%), seguido pelas células bacterianas (5% - 25%) (Geesey, 1992). Sua morfologia e consistência variam dependendo dos tipos de bactérias presente e das condições do meio que o envolve. O tempo necessário para a formação de um biofilme maduro pode variar de alguns dias até várias semanas. Com o aumento da espessura do biofilme, fica prejudicada a difusão de gases dissolvidos e outros nutrientes vindos do meio para o substrato. Nesse caso, as condições podem se tornar inóspitas para as bactérias localizadas na base do biofilme, e que se encontram distantes dos canais de água; como consequência, essas bactérias acabam morrendo. A competição por nutrientes também faz com que sejam perdidas muitas das vantagens da vida protegida dentro dos biofilmes. As células mais superficiais tendem a se desprender, indo colonizar novas áreas. O deslocamento das bactérias para novas áreas também serve para dispersar o genótipo e, portanto, para expandir a diversidade genética. Com a necessidade nutricional e com a base do biofilme abalada devido à morte de bactérias, o estresse causado pelo fluxo do meio e mecanismos de sinalização celular denominados “quorum sensing” (sensibilidade à densidade celular, ou ao quorum) ocorre o desprendimento de partes do biofilme, expondo áreas descobertas na superfície. O “quorum sensing” é causado por um acúmulo de moléculas de baixo peso molecular que, uma vez atingindo uma concentração limiar crítica, constituem sinais para que células individuais “sintam” que o limite da densidade populacional bacteriana foi atingido e iniciem uma resposta coordenada pela população (Fuqua e colaboradores, 1994). As áreas que se tornam expostas após o desprendimento são, subseqüentemente, recolonizadas e novas bactérias e suas SPE dão continuidade ao biofilme existente. Esse fenômeno de instabilidade ocorre mesmo quando as condições físicas permanecem constantes.

3.2.4. Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)

As substâncias poliméricas extracelulares foram definidas por Gessey, em 1982, como moléculas de origem biológica que participam da formação de agregados microbianos. Outra definição foi dada por Chracklis e Wilderer, em 1989, onde SPE foram descritas como polímeros orgânicos de origem microbiana que, em biofilmes, são responsáveis por unir células a outros materiais particulados (coesão) e ao substrato (adesão).

A produção de SPE ocorre em microrganismos procarióticos (Bactéria, Archeae) e eucarióticos (algas, fungos) e é uma propriedade geral destes microrganismos em ambientes naturais. No solo, em ambientes aquáticos, em tecidos vegetais e animais, bem como em sistemas como filtros e outros materiais porosos, reservatórios, tubulações, membranas de separação, entre inúmeros outros ambientes encontramos os biofilmes contendo populações mistas de microrganismos. Biofilmes desenvolvem aderência a superfícies sólidas (substrato) em interfaces sólido-líquido, mas também podem ser encontrados em interfaces como água-óleo, água-ar e sólido-ar. As SPE são responsáveis pela integridade estrutural e funcional e pelas propriedades biológicas e físico-químicas dos biofilmes. As SPE formam uma estrutura de gel tridimensional, altamente hidratada e geralmente carregada na matriz do biofilme, na qual os microrganismos estão envolvidos e parcialmente imobilizados (Figura 8). As SPE criam um microambiente para células sésseis que é condicionado pela natureza físico-química de sua matriz. Em geral, a proporção de SPE em um biofilme pode variar entre 59% a 90% do total da matéria orgânica como já mencionado (Christensen e Characklis, 1990; Nielsen e colaboradores, 1997).

Polissacarídeos têm sido apontados como os componentes mais abundantes de SPE (Costerton e colaboradores, 1985), talvez possa ser a razão pela qual substâncias poliméricas extracelulares também sejam referidas como polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos.

Macromoléculas orgânicas de SPE são formadas por polimerização de blocos constituintes como, por exemplo, polissacarídeos arranjados em unidades repetidas. Em função a esta natureza polimérica, SPE são também conhecidos como exopolímeros. SPE podem também conter substâncias não poliméricas de baixo peso molecular que podem alterar sua estrutura e propriedades físico-químicas. Proteínas podem ser

glicosiladas com oligossacarídeos para formar glicoproteínas ou podem se associar os ácidos graxos para formar lipoproteínas.

Por definição, SPE estão localizadas na superfície celular ou externamente à célula, independentemente da sua origem (Figura 6). A localização extracelular de SPE e sua composição podem ser resultado de diferentes processos: secreção ativa, deslocamento de material da superfície celular, lise celular e adsorção de compostos do ambiente.

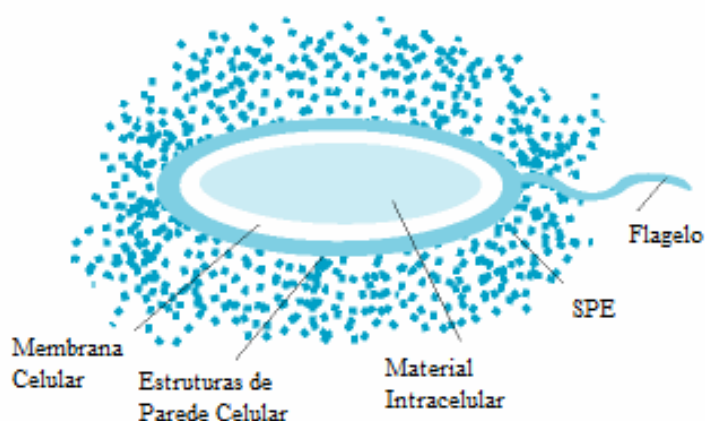


Figura 6 – Esquema representativo de uma bactéria envolta por substâncias poliméricas extracelulares. (Adaptado de Mittelman1985, <http://www.edstrom.com>).

Células vivas podem secretar ativamente os SPE. Várias vias específicas da biossíntese e mecanismo de exportação envolvendo a translocação de moléculas constituintes de SPE, através da membrana bacteriana para a superfície celular ou para o meio extracelular, foram descritos para proteínas bacterianas e polissacarídeo. DNA extracelular pode ser encontrado associado à SPE, mas não se sabe se o DNA é secretado ativamente ou liberado passivamente devido a um aumento de permeabilidade no envelope celular (J. Wingender).

BRS podem produzir uma grande quantidade de SPE, também compostas por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Beech e colaboradores, 1999a). Estudos bioquímicos e de microscopia têm demonstrado que a composição destes exopolímeros livres no meio difere daqueles que são sintetizados no interior do biofilme (Beech e Gaylard, 1991). O processo de adesão destes microrganismos a substratos metálicos e o processo de formação da matriz que circunda estas células quando aderidas ao metal podem ser influenciados por diferentes exopolímeros.

3.3. BACTÉRIAS PARTICIPANTES DA CIM

As bactérias são seres unicelulares e que apresentam parede celular rígida e sem núcleo. Podem apresentar diferentes formas: bacilos, esférica ou espiral. São geralmente pequenas, entre 0,2 e 5 μm de largura por 1 a 10 μm de comprimento, embora alguns filamentos possam apresentar dezenas de micrometros. (Videla, H.A., 2003). Sobrevivem a diferentes faixas de temperaturas entre 0°C e 25°C são denominadas de psicrófilas; entre 15°C e 45°C mesófilas e entre 45°C e 75°C termófilas. Quanto ao pH zero e 12, e um respeito ao teor de oxigênio, as bactérias podem ser divididas em aeróbias estritas (utilizam oxigênio dissolvido para o seu metabolismo), anaeróbias estritas (desenvolvem-se em ambientes isentos de oxigênio), anaeróbias facultativas (preferem condições anaeróbicas, mas também crescem em ambientes aeróbicos), aeróbias facultativas (preferem condições aeróbicas, mas também crescem em ambientes anaeróbicos) e microaerófilas (necessitam de baixas concentrações de oxigênio).

As bactérias produzem esporos que são estruturas funcionais que permitem aumentar a resistência a ambientes rigorosos como variações bruscas de temperatura, congelamento, ausência de água e outras. Os esporos podem permanecer por centenas de anos até encontrar condições favoráveis para germinar.

O metabolismo bacteriano compreende dois processos simultâneos como desassimilação e assimilação.

- Desassimilação ou catabolismo - Ocorrem reações de oxidação e redução, que fornecem energia ao organismo.
- Assimilação ou anabolismo - São todas as reações que utilizam a energia produzida no catabolismo para sintetizar novo material celular.

O crescimento e a reprodução de bactérias, como todos os microrganismos podem ser representados graficamente por meio de uma curva de crescimento. (Figura 7).

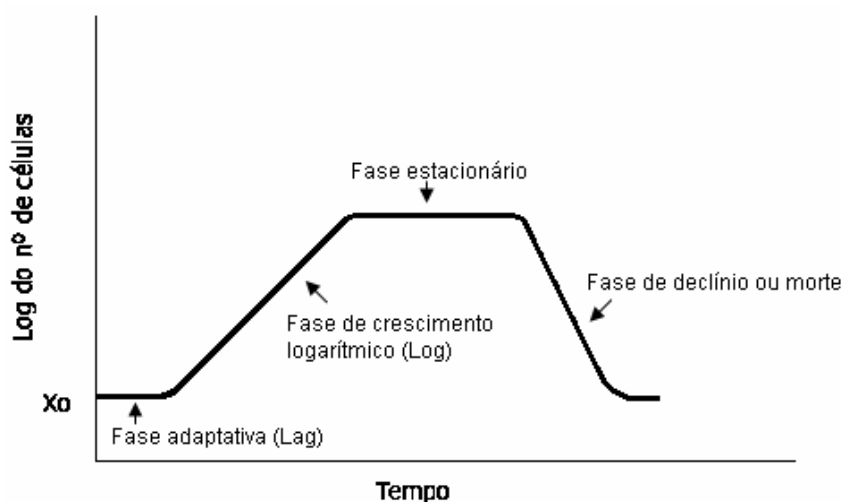


Figura 7 – Curva de crescimento bacteriano

O período de latência (fase lag) representa o tempo necessário para que as células inoculadas se adaptem ao meio e iniciem seu crescimento. Na fase logarítmica ou exponencial, as células crescem com velocidade constante. O término da fase logarítmica geralmente é definido pelo esgotamento do substrato disponível, iniciando-se a fase estacionária.

Nessa fase o número de células que se formam é igual ao número de células que morrem e o número total de microrganismo permanece praticamente constante.

Uma grande quantidade de microrganismos se relaciona em maior ou menor grau aos processos de biocorrosão e biofouling. Muitas das bactérias relacionadas a processos de corrosão fazem parte do ciclo do enxofre na natureza (figura 8).

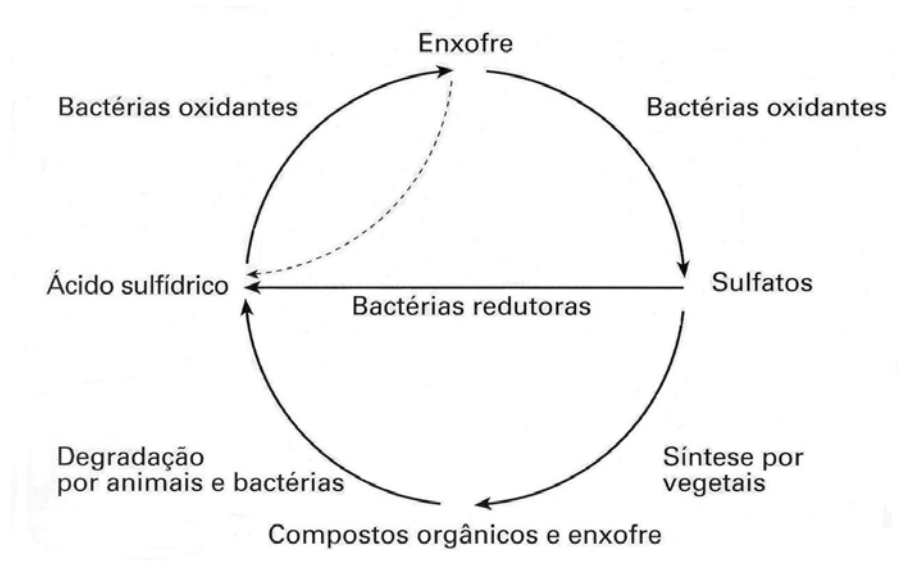


Figura 8 – Ciclo do enxofre (Videla, 2003).

Anteriormente foi descrito que as BRS são de grande importância na CIM. Apesar das BRS serem comumente associadas a processos corrosivos, outros grupos de bactérias também devem ser considerados, por contribuir direta ou indiretamente para a corrosão dos metais (Jack e Westlake, 1995). A atuação das bactérias sob a forma de consórcio microbiano tende a exercer um processo sinérgico que potencializa a corrosão. Como exemplo, algumas espécies produtoras de ácidos têm a característica de formarem ácidos orgânicos a partir da oxidação de hidrocarbonetos que, além de serem produtos corrosivos para o aço, podem funcionar como nutrientes para BRS. Um outro exemplo é o grupo das bactérias facultativas que criam condições adequadas ao desenvolvimento das espécies anaeróbias (como BRS) à medida que consomem o oxigênio do meio através do seu metabolismo.

Embora praticamente todos os tipos de microrganismos, vistos até o momento, se relacionem aos processos de biocorrosão e “biofouling” serão citados apenas os mais frequentes.

As bactérias oxidantes de enxofre, representadas pelo gênero *Thiobacillus*, são responsáveis pela corrosão devido à capacidade de produzir, através de suas vias metabólicas, uma elevada acidez no meio (aproximadamente, pH 0,5) uma vez que geram o ácido sulfúrico.

As bactérias oxidantes do ferro são representadas pelas principais espécies, a *Gallionella* e *Crenothrix* que são responsáveis por produzir entupimentos na indústria de extração de petróleo. Essas bactérias convertem o íon ferroso levando à formação de hidróxido férrico, ou íons manganosos a íons mangânicos para obtenção de energia. A formação destes compostos no metal faz com que ocorra um anodo isolado do oxigênio existente no meio, aumentando o ataque por célula de aeração diferencial e assim gerando as condições de anaerobiose necessárias às BRS que são causadoras diretas da corrosão (Videla, 2003).

As bactérias redutoras de sulfato constituem um grupo taxonomicamente diverso de procariotos anaeróbios estritos, que utilizam preferencialmente o sulfato como aceptor terminal de elétrons. O sulfato (SO_4^{2-}) funciona como um agente oxidante para a degradação de compostos orgânicos, assim como os organismos aeróbios usam oxigênio na respiração convencional (Postgate, 1984).

Além da utilização de sulfato como aceptor de elétrons, muitas BRS podem crescer usando nitrato (NO_3^-) como aceptor terminal, reduzindo-o a amônia (NH_3), ou podem usar certos compostos orgânicos para produção de energia por vias fermentativas

em completa falta de sulfato ou outros aceptores terminais de elétrons (Madigan e colaboradores, 1997).

3.4. BIOCIDAS

Biocidas são agentes antimicrobianos, utilizados com o objetivo de prevenir, inibir ou eliminar o crescimento microbiano.

O uso de biocidas no controle de biofilmes é comumente praticado. Embora os biocidas sejam usados para reduzir o número de bactérias, a simples utilização do biocida correto para aquele meio não reduz necessariamente a concentração dos microrganismos que se deseja combater. É essencial aplicar o biocida na concentração e na frequência correta.

A seleção de uma base ativa para um tratamento em particular, geralmente, é empírica ou embasada em experiências prévias de situações correlatas. Testes em sistemas estáticos e dinâmicos são muito utilizados pelos diversos setores da indústria para a avaliação de critérios de eficiência biocida de soluções químicas (Ludensky, 1999).

Na indústria do petróleo os biocidas podem ser aplicados nas tubulações através de doses de choque, doses contínuas, ou uma combinação de ambas. Quando colocados através de doses de choque, o biocida pode ser espalhado pelo sistema usando-se um “pig” ou através do fluxo do fluido presente na tubulação em questão (água de injeção, óleo, gás). Os métodos de dosagens de choque permitem a liberação do biocida concentrado no sistema, mas, geralmente, envolvem tratamento de produtos residuais. A injeção contínua fornece maior exposição ao sistema, mas pode ser problemático se os microrganismos se tornarem resistentes ao biocida empregado. Se isso ocorrer, a dose deve ser aumentada ou deve-se implementar um tratamento com um biocida alternativo (Gentil, 1996).

3.4.1. Biocidas e a resistência das bactérias

A atividade do agente químico ou biocida pode ser afetada por vários fatores, tais como, o tipo de organismo envolvido, a natureza química do biocida, a temperatura de contato, pH do meio ambiente e a presença de matéria orgânica.

Segundo Russel, 1995 existem dois mecanismos distintos de resistência bacteriana a biocidas, a resistência adquirida e a resistência intrínseca. A resistência intrínseca é uma propriedade natural controlada por cromossomos ou adaptação de um organismo. Existem várias formas de resistência intrínseca: o crescimento bacteriano na forma de biofilmes, tolerância fenotípica, resposta à falta de nutrientes, os aspectos morfológicos (mudança na parede celular de bactérias) e outros. A resistência adquirida é resultado da aquisição de plasmídios ou transposons codificando genes que conferem resistência para um agente microbiano particular, ou ainda a seleção de mutantes resistentes de uma população que foi exposta a um biocida.

A matriz extracelular está associada à resistência de biofilmes bacterianos a ampla variedade de biocidas utilizados. (Sutherland e colaboradores, 1999). Para alguns biocidas quimicamente reativos, a presença de SPE impede seu acesso às células subjacentes. Para outras categorias, as SPE prolongam, por alguns segundos, o tempo gasto pelo composto para atingir as áreas mais internas do biofilme. Este efeito pode ser maior quando as SPE encontram-se ligadas a enzimas capazes de degradar os biocidas.

3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE BIOFILMES

O conhecimento sobre os biofilmes tem sido adquirido através de observações microscópicas e por análises bioquímicas e taxonômicas destrutivas, ou seja, que alteram sua estrutura. A microscopia ótica convencional pode fornecer informações sobre a extensão da superfície (colonizada), distribuição dos microrganismos e atividade fisiológica. Entretanto, seu uso é limitado quando se estuda biofilmes maduros, onde a natureza tridimensional da comunidade mascara a observação dos microrganismos constituintes (Fletcher, 1994). A microscopia eletrônica trouxe um avanço considerável para a Microbiologia e é uma técnica muito utilizada para o estudo dos biofilmes. Devido ao seu alto poder de resolução, MET, (0,2 nm) é possível obter informações detalhadas sobre a distribuição e ultra-estrutura das células. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV), além das análises ultra-estruturais convencionais, oferecem, como apoio metodológico, análise de imagens espectroscópicas (ESI) e microanálise de raio-X (EDS). Estas técnicas são eficientes na localização e identificação de elementos químicos presentes nas moléculas das SPE, na estrutura das bactérias e em outros elementos do biofilme bacteriano.

Diferentes métodos são utilizados para caracterizar uma superfície e para visualização dos microrganismos com formação ou não de biofilme. Podem ser divididos em função da resolução atômica, nanométrica e micrométrica. As diferentes técnicas são:

- Microscopia Ótica (MO)
- Microscopia de Força Atômica (AFM)
- Microscopia de Confocal a Laser (MCL)
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET).

3.5.1. Microscopia Ótica

A técnica de microscopia óptica é a de aplicação mais difundida em função dos custos reduzidos em comparação com outros ramos da microscopia (Russ, J., 2007). Porém apresenta duas limitações importantes, a resolução limitada a um micrometro, em função do comprimento de onda da luz visível, e uma profundidade de campo restrita. Isto gera alguns problemas no exame de superfícies. Se a superfície não é plana o suficiente e perpendicular ao feixe óptico não é possível obter foco em toda área observada. Isto limita a capacidade de obter imagens de superfícies rugosas. Por outro lado, esta aparente limitação, pode apresentar-se vantajosa em medições de alturas superficiais através de técnicas de desfocalização. Um exemplo é a medição de profundidade de pites (Landolt, D., 2007).

3.5.2. Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) desenvolvida em 1986, mede as forças atrativas ou repulsivas entre sondas e os átomos superficiais (Landolt, D., 2007). Utiliza uma pequena sonda com formato piramidal, de nitreto de silício ou silício instalada num cantiléver que varre a superfície da amostra. O instrumento pode operar em diferentes modos. No modo de contato, quando uma força constante é aplicada entre a sonda e a amostra, forças repulsivas provocam uma deflexão no cantiléver monitorada por um detector. Este sinal é usado para gerar dados de amplitude que possibilitam medidas de

rugosidade. Outros modos de operação, como o *tapping*, são aplicados a materiais biológicos (Beech, I.B. et al, 2002).

3.5.3. Microscopia Confocal a Laser

Em 1987, um microscópio confocal com a capacidade de produzir imagens mais detalhadas de amostras biológicas foi construído através da combinação das tecnologias do laser, computacionais, e da microeletrônica. Brad Amos e John White foram pioneiros na construção do protótipo que incorpora as tecnologias e obtiveram melhor foco no confocal de imagens. Confocal é definido como “possuindo o mesmo foco” isso significa que no microscópio a imagem possui o mesmo foco ou focos correspondente ao ponto focal do objeto (Claxton).

O confocal é um microscópio de epifluorescência de alta tecnologia que permite a observação de corpos ópticos ($\sim 3\mu\text{m}$) horizontais e verticais, utilizando a fluorescência para aquisição de imagens, onde são excluídos os corpos ópticos que se encontram fora de foco. Através do confocal podemos documentar a morfologia e fisiologia do biofilme sob condições *in situ* (Palmer e Sterberg, 1999), em termos de espessura, área de superfície colonizada, densidade bacteriana e tempo de colonização do substrato sólido. A organização tridimensional do biofilme pode ser estudada correlacionando-a com outras informações, tais como: composição de espécies, relação com o substrato, estado fisiológico das bactérias, entre outros. A observação direta de populações microbianas e atividade biológica são necessárias para proporcionar informações exatas sobre a dinâmica de agregação celular, processos metabólicos, e resistência a agentes microbianos dentro de uma estrutura de biofilme funcional. Análises de biofilmes microbianos podem ser realizadas através da utilização de uma grande variedade de sondas fluorescentes.

3.5.4. Microscopia Eletrônica

Existem dois tipos principais: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

No microscópio eletrônico de varredura (MEV) um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para varrer a amostra – isto é, ele é movido para diante e para trás enquanto passa sobre a amostra. O feixe interage com a superfície da amostra,

significando várias interações, entre elas a emissão de elétrons secundários que permite a observação da topográfica da superfície. A imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que a amostra é varrida. Os primeiros modelos de MEV comercializados no mercado, foram em 1965 (Cambridge instrumentos científicos – modelo Stereoscan), e desde então se têm revelado indispensáveis em muitos tipos de pesquisa biológica.

Elétrons secundários (ES) são elétrons que são ejetados de átomos da amostra devido a interações inelásticas dos elétrons energéticos do feixe primário com elétrons pouco energéticos da banda de condução nos metais ou de valência nos semicondutores e isolantes. Por definição os elétrons que são emitidos da amostra com energia inferior a 50 eV são chamados de elétrons secundários. Portanto, os elétrons secundários são definidos somente com base na sua energia cinética. Dentro desta faixa de energia é claro que sempre existirá alguns elétrons retroespalhados que perderam quase toda a sua energia, mas como a sua contribuição é muito pequena eles podem ser efetivamente ignorados.

De todos os sinais que podem ser usados para análise de amostras no MEV o sinal de elétrons secundários é o mais usado. Os ES são formados em todo o volume de interação do feixe eletrônico com a amostra, mas somente aqueles gerados numa distância em que possa haver escape é que trarão informações para o microscopista. Basicamente, os elétrons secundários são gerados pelos elétrons do feixe primário, a medida que o mesmo vai penetrando na amostra, e também pelos elétrons retroespalhados quando estes vão deixando a amostra, conforme foi visto na Figura 9.

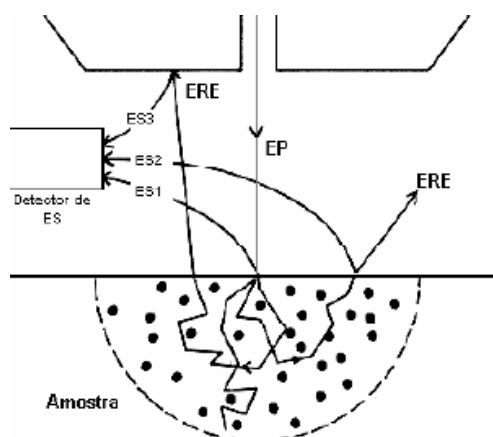


Figura 9 – Esquema de produção dos elétrons secundários e retroespalhados

A imagem observada no MEV é o resultado da variação de contraste que ocorre quando um feixe de elétrons primários varre a superfície da amostra em análise ponto a ponto. De maneira geral, as variações de contraste ponto a ponto ocorrem devido a variação do número de elétrons que são emitidos da amostra e que atingem o detector. As informações contidas numa imagem só podem ser corretamente interpretadas se o mecanismo que originou este contraste for corretamente entendido. Por esta razão, a seguir serão explicados os mais importantes mecanismos de contraste associados com as imagens de elétrons secundários.

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é desta forma chamada pelo fato da imagem da amostra ser formada pela passagem do feixe de luz através dele.

O emprego do MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois ele permite definição de imagens intracelulares, permitindo estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação de parasitas com as células, fornecendo informações sobre alterações e efeitos citoplasmáticos ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias e outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia de luz (Galleti, 2003).

O MET é um instrumento para estudar os detalhes mais finos de uma estrutura celular, ou a organização molecular de bactérias, vírus ou constituintes subcelulares. No entanto, para se alcançar esta alta resolução em um instrumento muito complexo como o MET, as amostras devem ser extremamente finas e é difícil obter informação sobre estruturas em três dimensões, no entanto o MEV é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos, formação de biofilmes entre outras análises, mas fornece pouca, ou nenhuma informação sobre a estrutura interna.

3.5.5. Protocolo de preparação de Amostras para MEV

A preparação de amostras biológicas para observação em MEV, necessita de um protocolo especial. A literatura apresenta vários trabalhos utilizando diferentes protocolos para amostras com formação de biofilme em diversos meios de cultivo, porém não foram encontrados trabalhos com formação de biofilme em estudo dinâmico na presença de fluido oleoso.

Existem dois métodos de fixação de amostras biológicas: métodos físicos e químicos. Os métodos físicos são: secagem ao ar e criofixação e os métodos químicos de fixação ocorrem através de substâncias químicas como: aldeído glutárico, tetróxido

de ósmio, formaldeído e outros. A fixação é o processo pelo qual se obtém estabilização das estruturas celulares e intercelulares. A fixação por melhor que seja realizada, inevitavelmente introduzirá perturbações no sistema.

Segundo Penna, 2004 o protocolo de preparo de amostras biológicas para MEV foi realizado fixando a amostra em 5,0% de glutaraldeído em 0,1M de solução de tampão Cacodilato de sódio, posteriormente é feita uma bateria de dessalinização (15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%) e depois a bateria de desidratação com a mesma porcentagem da anterior. As amostras são levadas ao ponto crítico e depois metalizadas.

Como descrito por Richards, 1984 o protocolo utilizado para MEV ocorreu da seguinte forma, as amostras são fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,2M de tampão cacodilato com pH 7,2, mantido a 4° C por 24 horas. Após as amostras fixadas são lavadas duas vezes em água destilada e depois congeladas para criofratura.

Estudos realizados por Barreto, 2007 utilizaram um tratamento prévio com vapor de ósmio por 24 horas e depois são fixadas com glutaraldeído por 3 horas. As amostras depois da fixação foram desidratadas em bateria de etanol à 4° C e levadas ao ponto crítico e depois metalizadas.

O preparo de amostras segundo Weber, 1978 foi realizado com imersão da amostra por 2 horas em 2% de paraformoldeído – 2,5% de solução de glutaraldeído em 0,1M de tampão fosfato com salina (PBS) com pH 7,3. Uma pós-fixação por 3 horas utilizando 1% de tetróxido de ósmio em 0,1M de PBS com pH 7,3. Subseqüente bateria de desidratação (50, 70, 80, 90 e 100%). Em seqüência as amostras foram levadas ao ponto crítico e depois metalizadas.

O presente trabalho só realizou fixação com métodos químicos, onde foram empregadas substâncias que reagem com determinados sítios das biomacromoléculas estabilizando-as. A fixação química além de estabilizar as moléculas visa torná-las, ao mesmo tempo, condutoras. Na formulação do fixador, ajustam-se as condições ideais de concentração, pH, molaridade, etc., de acordo com o material. O fixador é geralmente aplicado à temperatura ambiente, por imersão. O tempo de ação do fixador pode ser de algumas horas a vários dias, quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime (Souza, 2003).

O tetróxido de ósmio é um fixador já utilizado desde o começo do século XX para obtenção de uma melhor preservação citológica ao nível do microscópio ótico. Esta substância foi utilizada pela primeira vez por Palade em 1952 no preparo de amostras para microscopia eletrônica. O tetróxido de ósmio protege as lipoproteínas naturais das

células e dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. O tetróxido de ósmio estabiliza e contrasta especialmente os fosfolípidos constituintes da membrana citoplasmática (Souza, 2003).

A amostra é fixado por agentes químicos que o tornam resistente, é desidratada com acetona ou etanol e posteriormente substituídos por gás carbônico liquefeito, na câmara do aparelho de ponto crítico. O CO₂ líquido é lentamente aquecido, e passa imperceptivelmente da fase líquida para a gasosa; a expansão deste gás dentro da câmara faz a pressão subir, até acima da pressão crítica do CO₂ (73 atm). Mantendo-se a temperatura da câmara acima de 31° C (temperatura crítica do CO₂) não há risco de liquefação do gás. Nesta transição de fase gradual, a densidade da fase líquida iguala àquela da fase gasosa. Portanto, a tensão superficial é zero e o espécime é seco sem a ultrapassagem de nenhum limite de fases, isto é, sem o efeito das forças atuantes de tensão superficial. Após a despressurização lenta da câmara até à pressão atmosférica, o espécime é removido seco da câmara, sem alterações sensíveis de forma (Souza, 2003).

De uma forma geral, para observar amostras no MEV estas precisam ser montadas no suporte (porta-amostras) da câmara do microscópio, considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e o coletor de elétrons secundários. Conforme as dimensões da amostra podem ser usadas vários tipos de adesivos, como colas condutoras de prata ou carbono coloidal; esmalte de unha em quantidade mínima e fitas adesivas também podem ser empregadas. As fitas devem ser recortadas em dimensões reduzidas e bordejadas com um filete de prata coloidal para melhorar a condutividade.

A deposição de metais (Ag, Au) por pulverização catódica nas amostras biológicas de modo a torná-los bons condutores térmicos e elétricos é fundamental para se obter as imagens. A camada condutora é geralmente ouro ou carbono, evaporados em vácuo. O metal é usualmente depositado pelo processo de "sputtering", embora possam também ser evaporados em alto vácuo. No sistema de "sputtering" o depósito do metal é bastante eficiente, mesmo em objetos muito irregulares, pois os átomos atingem sua superfície oriundos de todas as direções. Tanto os espécimes, como as lamínulas de vidro ou as fitas adesivas usadas na montagem são isolantes elétricos e ficam carregados negativamente durante a varredura do feixe eletrônico. Devido ainda à irradiação do feixe, a amostra pode ficar aquecida e, se for sensível, pode mover-se ou mesmo ser destruída durante a observação no MEV (Castro, 2002).

Uma característica destas amostras é que estas são higroscópicas e devem ser analisadas imediatamente no MEV. No entanto, com certo cuidado, podem ser armazenadas por um tempo determinado em dessecador contendo sílica-gel, se necessário.