

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL E MATERIAIS UTILIZADOS

3.1. Biocidas utilizados

Os compostos químicos utilizados nos experimentos de corrosão e análise microbiológica foram o hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio, em dosagens normalmente aplicadas em sistemas de resfriamento industriais e em valores de pH típicos de águas de resfriamento.

Os biocidas, respectivos princípios ativos, dosagens aplicadas e pH estão listados na **Tabela 3**:

Biocida	Fabricante	Fórmula	Concentração (% do P.A)	pH	Dosagens (ppm)
Peróxido de hidrogênio	Peróxidos do Brasil	H ₂ O ₂	30	5.5 e 8.5	2 e 6
Hipoclorito de Sódio	Vetec	NaClO	6	5.5 e 8.5	2 e 6 (cloro total)

Tabela 3 – Reagentes utilizados como biocidas e condições de aplicação.

3.2. Ensaio de Corrosão

Os experimentos de corrosão foram realizados com o objetivo de estimar e comparar a taxa de corrosão dos dois biocidas avaliados em cupons de aço-carbono AISI 1020, material representativo de tubulações industriais, trocadores de calor e sistemas de resfriamento. A taxa de corrosão foi determinada calculando-se a perda de massa nos cupons de prova que foram expostos ao meio corrosivo durante um determinado período de exposição.

3.2.1. Preparação dos Cupons metálicos

Os cupons metálicos utilizados na pesquisa foram de aço carbono AISI 1020 (C 0,16; Mn 0,63, P 0,012; Smáx 0,031; Si 0,012; Cu 0,01; Cr 0,03; Ni 0,01), com área de 26,2 cm².

Os cupons metálicos foram preparados de acordo com os procedimentos da norma NACE TM 0193-2000 para testes estáticos de corrosão em temperaturas abaixo de 93⁰C. Antes de serem testados, os cupons foram polidos com lixa de granulometria 120 com o objetivo de retirar depósitos aderidos à sua superfície e armazenados em dessecador até a realização do processo de limpeza.

Foi necessário remover a camada de gordura proveniente do manuseio colocando os cupons metálicos imersos em álcool isopropílico durante aproximadamente 5 minutos. Após serem removidos do álcool isopropílico, os cupons foram enxaguados sucessivas vezes com água desmineralizada e acetona e limpos com detergente diluído usando-se uma escova de nylon. Os cupons limpos foram então enxaguados novamente com água destilada e acetona e finalmente secados em estufa a 115⁰C durante aproximadamente 15 minutos. Terminado todo o processo de limpeza, os cupons foram manuseados com pinças e luvas a fim de evitar qualquer contaminação das mãos sobre a superfície metálica e armazenados em dessecador até o momento de uso.

3.2.2. Testes estáticos de corrosão

As experiências foram conduzidas em recipientes plásticos de 6 litros de capacidade contendo 4 litros de água destilada, que foi dosada nas concentrações de 2,0 ppm e 6,0 ppm dos biocidas e em dois valores de pH, 5,5 e 8,5. A escolha da água destilada foi feita em função de sua pureza, de modo a evitar a interferência de outros compostos dissolvidos na água no processo de corrosão. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (25 ± 1⁰C).

Antes de serem expostos ao meio corrosivo, os cupons foram pesados ao milésimo de grama em balança analítica (Marte, AL-500) e, só então, utilizados nos experimentos.

Os cupons foram dispostos internamente nos recipientes plásticos e posicionados de modo a ficarem igualmente expostos ao volume de água dentro do recipiente. Os cupons foram expostos aos seguintes meios corrosivos:

A.- Água destilada contendo 2,0 e 6,0 ppm de peróxido de hidrogênio em pH 5,5.

B.- Água destilada contendo 2,0 e 6,0 ppm de peróxido de hidrogênio em pH 8,5.

C.- Água destilada contendo 2,0 e 6,0 ppm de cloro total em pH 5,5.

D.- Água destilada contendo 2,0 e 6,0 ppm de cloro total em pH 8,5.

E.- Água destilada sem adição de biocida em pH 5,5.

F.- Água destilada sem adição de biocida em pH 8,5.

Os biocidas foram adicionados diretamente aos recipientes, gotejando-se os reagentes na água. As concentrações de 2,0 e 6,0 ppm de cloro total e peróxido de hidrogênio foram reguladas com o auxílio de um fotômetro (Merck, Nova 60) e kits para determinar as concentrações de cloro total e peróxido de hidrogênio na água. Imediatamente após a adição dos biocidas, o pH em cada recipiente era ajustado através da adição de soluções de NaOH 2 M e HCl 0,6 N e regulado utilizando-se um eletrodo de vidro sensível aos íons H^+ imerso na água e conectado a um potenciômetro (Micronal, B-375). Antes de adicionar os cupons de prova ao recipiente, o pH da água foi medido novamente e regulado através do potenciômetro. O controle do pH foi mantido até o final em todas as experiências e acompanhado durante todo o experimento em cada recipiente.

O período de exposição foi de 96 horas e após 24 horas de exposição, as concentrações de cloro total e peróxido de hidrogênio foram medidas utilizando-se o fotômetro. Uma vez que estes compostos sofrem decomposição ao longo do tempo, foi necessário repor as concentrações para os valores iniciais após as primeiras 48 horas.

Todos os testes estáticos foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade dos resultados. A **Figura 9** mostra o aparato experimental utilizado:

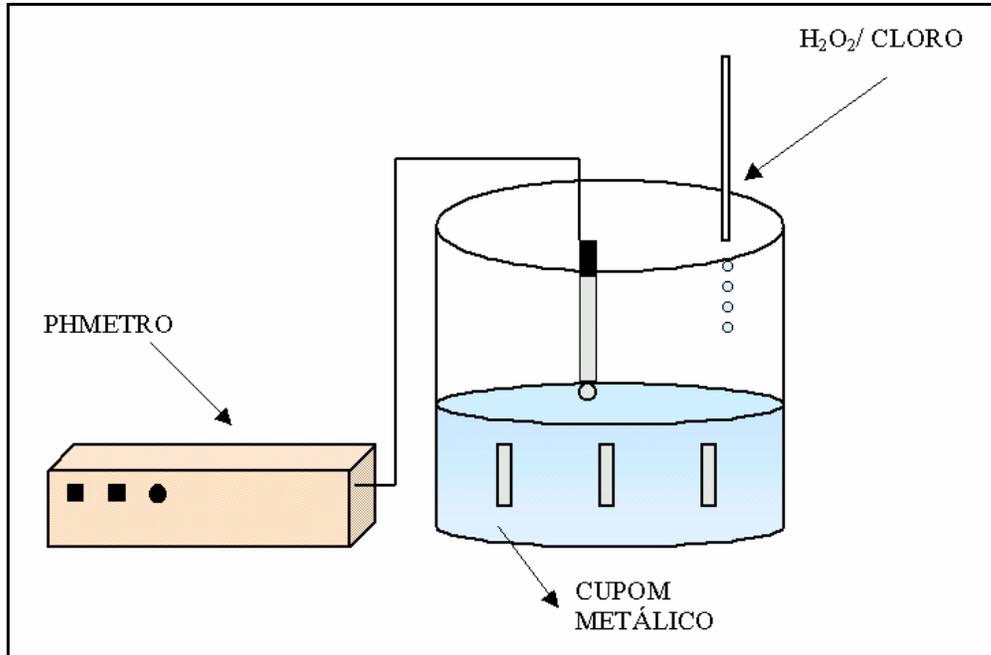


Figura 9 – Aparato experimental utilizado nos testes estáticos.

Passadas 96 horas de exposição, os cupons foram retirados do recipiente, enxaguados com água destilada, acetona e limpos com escova de nylon para retirar depósitos e produtos de corrosão aderidos em sua superfície. Após este procedimento, os cupons foram novamente enxaguados com água destilada e acetona, colocados em estufa para secagem à 115⁰C durante aproximadamente 15 minutos e armazenados em dessecador para posterior pesagem e cálculo da taxa de corrosão.

3.3. Análise Bacteriológica

Os experimentos de contagem bacteriana foram com o objetivo de examinar quantitativamente a carga microbiana nas amostras de água sem adição de biocidas e quando tratadas com cloro e peróxido de hidrogênio em diferentes valores de pH.

A qualidade microbiológica das amostras foi avaliada através da metodologia “Heterotrophic Plate Count”, realizada pela técnica de contagem padrão em placas de petri, recomendada pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

Procedeu-se à contagem bacteriana adicionando-se pequenas alíquotas da água a ser analisada em placas de petri e utilizando o meio de cultura APC (Agar Padrão de Contagem). Segundo Picanço (2002), esse método proporciona conhecer o número de microrganismos viáveis na água inoculada no sistema, ao utilizar um meio de cultivo rico e não seletivo para as bactérias escolhidas nas análises.

A análise microbiológica foi realizada com água da torre de resfriamento de uma indústria siderúrgica localizada na cidade do Rio de Janeiro. Esta água foi coletada na bacia da torre e ficou exposta durante aproximadamente uma semana à atmosfera industrial, visando a adquirir as características da microbiota local.

De acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998), quando são esperadas concentrações muito altas de microrganismos, torna-se necessário diluir a amostra para obter valores mais confiáveis. A contagem bacteriana foi realizada através de diluições diretas obtidas a partir das amostras líquidas, utilizando-se solução estéril de água peptonada 0,1%.

O experimento foi efetuado nas seguintes etapas:

3.3.1.**Preparação do Meio de Cultura**

Adiciona-se o meio de cultura em água destilada, homogeneizando e aquecendo a solução até fervura. Após a fervura da solução, a mesma foi resfriada e transferida em alíquotas de 20 mL para tubos de ensaio. Os tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura foram então esterilizados para posteriormente serem utilizados nos testes.

3.3.2.**Preparação da água peptonada**

Adicionou-se 1 g de peptona em 1 litro de água destilada, obtendo-se uma solução 0,1%. Transferiu-se alíquotas de 9 mL desta solução para tubos de ensaio, que foram identificados e posteriormente utilizados na diluições realizadas nas experiências.

3.3.3.**Preparação das amostras de água de resfriamento**

As amostras de água de resfriamento usadas nas experiências foram dosadas com concentrações de 2,0 e 6,0 ppm de cloro e peróxido de hidrogênio. Para aplicar estas concentrações dos biocidas na água, utilizou-se um fotômetro com sensibilidade para detectar tais concentrações (Merck, Nova 60) e seus respectivos kits de ensaio para medir concentração de peróxido de hidrogênio e cloro total dosados nas amostras, conforme método já descrito nos ensaios de corrosão. O pH foi fixado sempre após a adição dos biocidas e em todos os experimentos realizados. O ajuste do pH foi feito através de um potenciômetro. O tempo de ação dos biocidas nas amostras foi de 20 minutos e 5 horas, com o intuito de avaliar o desempenho dos produtos em diferentes tempos de contato. Nos experimentos realizados com 5 horas de duração, a decomposição do cloro e do peróxido de hidrogênio foi monitorada ao longo do tempo, realizando-se medidas das concentrações em intervalos de 30 minutos e quando necessário, repondo as dosagens dos biocidas para os valores inicialmente aplicados.

3.3.4. Determinação da temperatura de incubação

Antes de efetuar os ensaios de contagem bacteriana aplicando-se os biocidas, foi realizado um ensaio preliminar na água de resfriamento com o objetivo de investigar qual seria a temperatura de incubação que permitiria uma maior recuperação de microrganismos.

Este ensaio seguiu o mesmo procedimento experimental adotado nas demais contagens bacterianas, porém não foi realizado por meio de diluições e foram adotadas duas temperaturas de incubação, 25⁰C e 37⁰C, com o intuito de comparar a diferença de crescimento bacteriano nestas duas condições.

3.3.5. Avaliação do efeito biocida na água de resfriamento

Decorrido o tempo de ação dos biocidas, adicionou-se uma quantidade de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃. 5H₂O) suficiente para degradar os residuais de cloro e peróxido de hidrogênio na água, pois estes compostos podem prejudicar o crescimento bacteriano quando a alíquota for adicionada à placa de petri, conduzindo a resultados imprecisos. Como controle negativo, foram realizadas contagens bacterianas em amostras sem adição de biocida, com o intuito de conhecer a carga total de bactérias presente nas amostras.

3.3.6. Semeadura e inoculação em placas de petri

Transferiu-se alíquotas de 1 mL das amostras de água de resfriamento sem adição de biocida e já tratadas com os biocidas para os tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, obtendo-se a primeira diluição (10⁻¹). A partir da diluição inicial, efetuou-se as demais diluições em água peptonada, obtendo-se as diluições 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ mL.

Após a diluição das amostras, transferiu-se 1 mL de cada diluição para as placas de petri e logo em seguida adiciona-se o meio de cultura às placas. As placas foram então incubadas em estufa bacteriologia durante 48 horas e na temperatura adequada.

3.3.7. Incubação e contagem de colônias nas placas de petri

Todos os ensaios com amostras sem biocida e com aplicação de cloro e peróxido de hidrogênio foram realizados em duplicata e nas diluições 10^{-1} até 10^{-5} . Após retirar as placas da estufa depois de 48 horas de incubação a 37°C , foi realizada a contagem das bactérias nas placas e obteve-se o valor final calculando-se a média de todas as contagens fornecidas em cada diluição.

A **Figura 10** ilustra os principais procedimentos realizados durante o experimento:

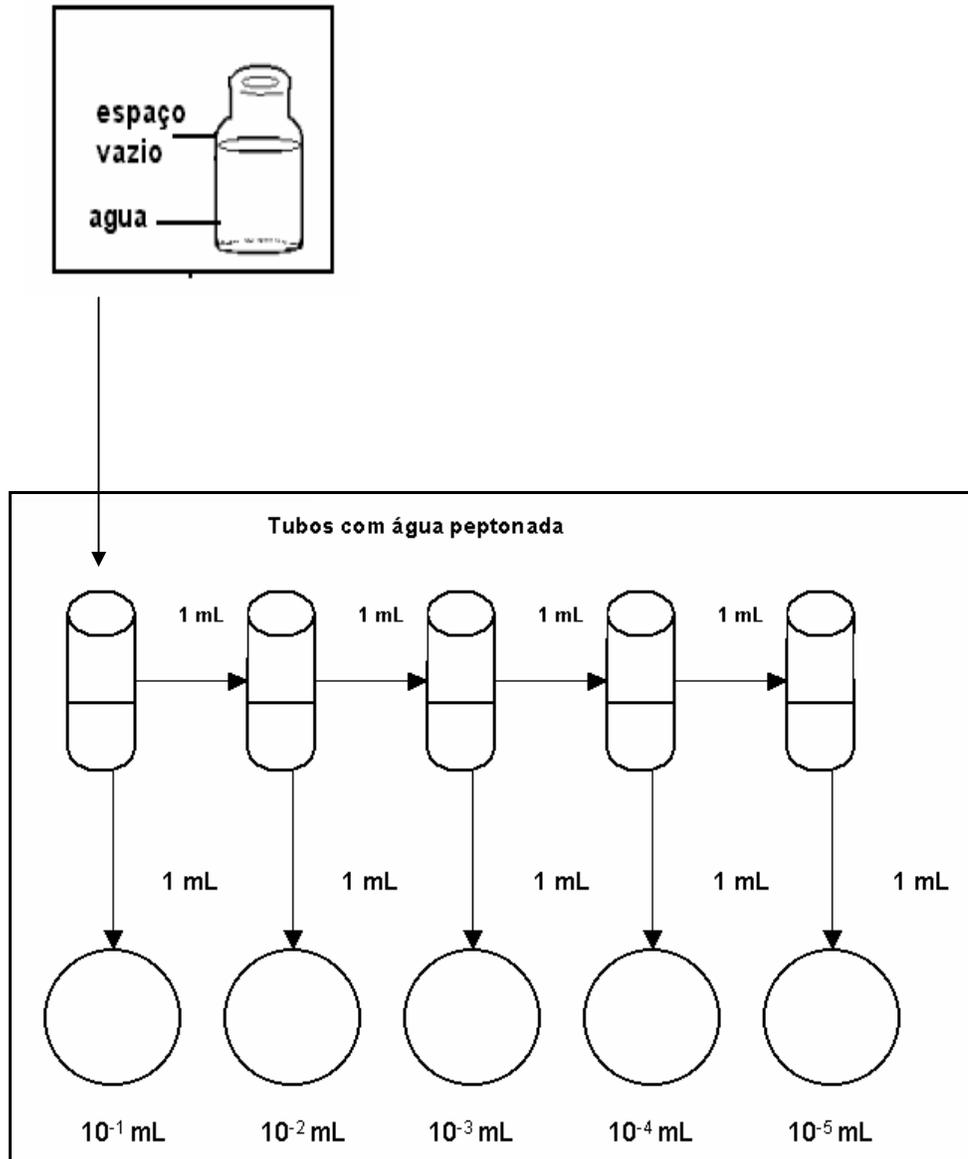


Figura 10 – Diluição e inoculação em placas de petri.

3.3.8.**Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)**

A contagem de bactérias em cada placa de petri foi realizada contando-se o número de unidades formadoras de colônia em cada placa. Ao final da contagem, multiplica-se o valor encontrado de unidades formadoras de colônias pelo inverso da diluição correspondente. Como exemplo ilustrativo, a **Figura 11** mostra a uma contagem obtida na diluição 10^{-5} mL quando a água foi dosada com 6.0 ppm de peróxido de hidrogênio.

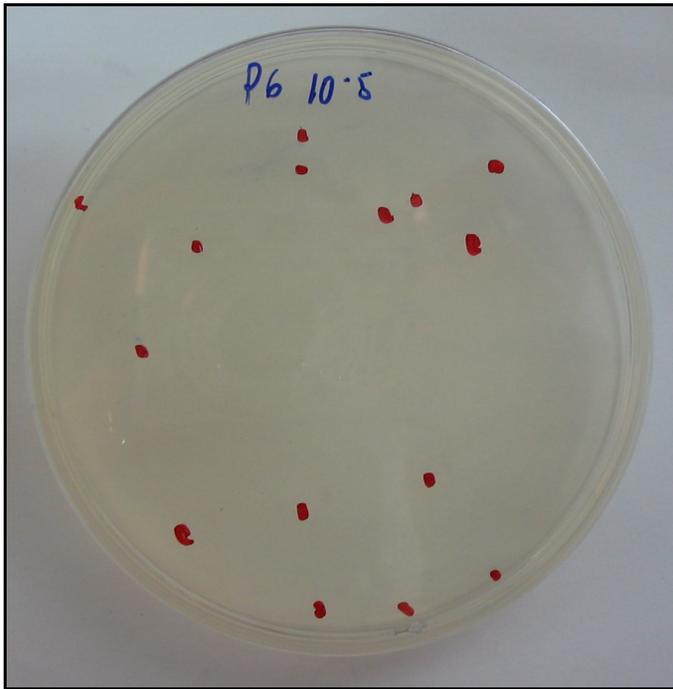


Figura 11 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) na diluição 10^{-5} mL.

Os pontos marcados com caneta vermelha representam as unidades formadoras de colônias encontradas na amostra. Neste exemplo, foram encontradas 15 UFC, que multiplicadas pelo inverso do fator de diluição, resultam em 15×10^5 UFC/mL ou 1.5×10^6 UFC/mL.

3.3.9.**Avaliação da microbiota presente na água de resfriamento**

Este ensaio teve por objetivo investigar quais eram os principais grupos bacterianos presentes na água de resfriamento utilizada nos experimentos.

Neste teste, foram adicionados 50 mL do meio de cultura APC em uma placa de petri. Após a solidificação do meio de cultivo na placa, uma alíquota de 0,1 mL da água de resfriamento sem adição de nenhum biocida foi espalhada por toda a placa com o auxílio de uma pipeta estéril.

Esta placa foi incubada durante 48 horas na temperatura de 37⁰C e após o período de incubação, as colônias de bactérias foram avaliadas sob o aspecto visual.

3.3.10.**Análise físico-química da água de resfriamento**

Substâncias orgânicas e inorgânicas presentes na água podem afetar a ação biocida do cloro e do peróxido de hidrogênio quando dosados em água.

Esta análise teve por objetivo levantar alguns parâmetros físico-químicos que podem influenciar na ação dos biocidas e obter resultados que permitissem auxiliar na investigação do desempenho do cloro e do peróxido de hidrogênio como biocidas.

Foram analisados os seguintes parâmetros:

A.- Dureza Total.

B.- Alcalinidade Total.

C.- Turbidez.

D.- Sólidos Suspensos Totais (SST).

E.- Sólidos Dissolvidos Totais (SDT).

F.- Condutividade.

G.- Carbono Orgânico Dissolvido.

H.- Sulfato