



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**TAMIRES BARRETO CIDADE**

**CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS COMPONENTES MINERAIS DE BIOFILMES**

**FORTALEZA**

**2011**

TAMIRES BARRETO CIDADE

CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS COMPONENTES MINERAIS DE BIOFILMES

Monografia submetida à coordenação do curso de Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Engenheira Química.

Orientador: Prof. DSc. João José Hiluy Filho.

FORTALEZA

2011

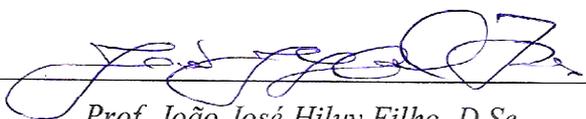
TAMIRES BARRETO CIDADE

CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS COMPONENTES MINERAIS DE BIOFILMES

Trabalho Final de Curso submetido à coordenação do curso de Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Engenharia Química.

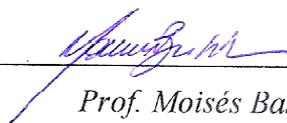
Aprovada em 25/11/2011

**BANCA EXAMINADORA**



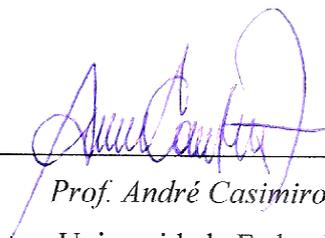
*Prof. João José Hiluy Filho, D.Sc*

Universidade Federal do Ceará - UFC



*Prof. Moisés Bastos Neto, D.Sc*

Universidade Federal do Ceará - UFC



*Prof. André Casimiro de Macedo, D.Sc*

Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus,  
Aos meus familiares,  
Aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e ser minha fonte de fé e coragem durante toda a formulação desse projeto, assim como em todos os momentos da minha vida.

Ao Professor Jean Lédion, meu tutor na França e professor responsável do Laboratório de Corrosão na École des Arts et Métiers de Paris pela formação à mim concedida, além das horas à mim dedicadas durante todo o processo de formulação desse projeto.

Ao professor Hosiberto Batista, por acreditar no meu potencial desde o início e me oferecer a minha primeira experiência em um laboratório, assim como pelos momentos fora do laboratório onde se mostrava acima de tudo um amigo.

Ao professor Hiluy, por aceitar ser meu tutor nesse projeto, pelo apoio fornecido durante o meu processo de seleção para o Brafitec, pelas excelentes aulas e por sempre compartilhar suas experiências e conhecimentos com seus os alunos.

A todos os professores do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, responsáveis pelos meus conhecimentos técnicos e teóricos adquiridos durante minha formação.

A minha mãe Cristina Girão e minha Irmã Tâmara Barreto, pelos ensinamentos de vida, pelo apoio incondicional, pelas palavras de consolo nos momentos mais difíceis e principalmente pelo amor, carinho e atenção a mim dedicados durante todos esses anos de vida.

Ao meu namorado Alexis Béziau, por ser meu companheiro em todos os momentos, por ser o responsável por momentos de enorme alegria, por me ouvir, me entender, me apoiar, pela sua cumplicidade, enfim, por ser essa pessoa maravilhosa e à quem eu admiro, respeito e amo muito.

Aos meus amigos da UFC: Regiane, Ju, Carol, Filipe Xavier, João, Régis, Humberto, Ticiane, Wilton e Rafael, por estarem sempre comigo, me ajudando, me fazendo rir e cuidando de mim.

Aos meus amigos brasileiros que conheci na França: Arielly, Isabella, Bruna, Ezequiel, Jonas, Ewerton, por terem sido minha família durante todo o tempo que estive fora do Brasil.

Ao Professor Moisés, Ronan e Bruninha por todas as manhãs de descontração, cheias de alegria e bom humor nesse meu último e tão difícil semestre, e por todo apoio fornecido em cada momento.

As minhas amigas Ana Raquel e Clivia, minhas amigas de anos e anos, que já considero parte da minha família.

A minha família, por todo suporte e carinho.

‘Il y a la nature qui est la chose que Dieu fait immédiatement  
et il y a l'art qui est la chose que Dieu fait à travers le cerveau  
de l'Homme.’  
**Victor Hugo**

## RESUMO

O acúmulo de biofilmes em tanques de estocagem, tubulações e equipamentos industriais em geral, vão de encontro às normas de qualidade e higiene, além de ocasionarem problemas de corrosão, perda de carga, dentre outros. O objetivo principal deste projeto é apresentar o estudo da evolução do biofilme e da sua composição mineral ao longo do tempo, em duas condições de vazão e em tubos de diferentes materiais, tais como: borracha, polietileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável, titânio e cobre. Para tanto, foram feitas análises mensais de infravermelho (IR) em amostras provenientes das superfícies internas e externas dos tubos dos diferentes materiais supracitados antes e após sua calcinação. Observou-se um acúmulo de biofilme no fundo do reservatório, oriundo do desprendimento deste das superfícies externas dos materiais mais nutritivos. Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas no sentido de diferenciar os alumino silicatos dos fosfatos, uma vez que ambos apresentam os mesmos picos característicos no IR. Constatou-se que os biofilmes apresentam sempre componentes minerais, na forma de alumino silicatos e fosfatos, e que seu desenvolvimento é favorecido em materiais nutritivos e na superfície interna dos tubos, onde há uma vazão de recirculação. Concluiu-se também que os materiais nutritivos, além de favorecerem diretamente a formação dos biofilmes em suas superfícies, possuem uma influência indireta no crescimento destes nos demais materiais.

Palavras-Chave: Biofilme; Análise de IR; Alumino Silicato e Fosfato.

## RÉSUMÉ

L'accumulation de biofilms dans les citernes de stockage, dans les tuyauteries et les équipements industriels en général peut porter préjudice à l'image de la société car ceux-ci vont à l'encontre des normes de qualité et d'hygiène, en plus de pouvoir provoquer d'éventuels soucis de corrosion ou de pertes de charges entre autres. L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'évolution du biofilm et de sa composition minérale, au fil du temps, sous deux conditions de débits, et sur différents matériaux tels que : le caoutchouc, le polyéthylène, le polyéthylène basse densité, l'acier inoxydable, le titane et le cuivre. Pour cela, des mesures IR ont été réalisées sur des prélèvements mensuels sur les parois internes et externes des tubes des différents matériaux ci-dessus avant et après calcination. Il a alors été observé une accumulation de biofilms au fond du réservoir, provenant du détachement de ces derniers des parois externes aux matériaux les plus nutritifs. Des analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) ont ensuite été effectuées dans le but de différencier l'Aluminosilicate du Phosphate, lorsque les deux présentaient les mêmes pics caractéristiques aux IR. On constate alors que les biofilms comportaient toujours des composantes minérales, sous la forme d'Aluminosilicates et des Phosphates, et que leur développement était favorisé sur les matériaux nutritifs et sur les parois internes des tubes, où il y a une circulation d'eau plus importante. Cette étude montre également que les matériaux nutritifs, en plus de favoriser directement la formation des biofilms sur leurs surfaces, ont une influence indirecte sur la croissance de ces derniers sur les autres matériaux.

Mots clés : Biofilm; Analyse par IR, Aluminosilicates et Phosphates.

## ABSTRACT

The accumulation of biofilms on storage tanks, pipes and industrial equipments, affects the company's image with regard to standards of quality and hygiene, in addition to the potential problems of corrosion, pressure drop among, and others which can also result from such accumulation. The main objective of this project is to study the evolution of the biofilm and of its mineral composition over the time with two flow conditions and on different materials such as rubber, polyethylene, low-density polyethylene, stainless steel, titanium and copper. In order to do that, IR analyses have been made on samples taken monthly from the internal and external surfaces of tubes of different materials before and after calcination. There was an accumulation of biofilm on the bottom of the reservoir, which came from the detachment of the external surfaces of the more nutritious materials. Then, analyses of scanning electron microscopy (SEM) have been performed in order to differentiate the aluminium silicates from phosphate, because both of them had the same characteristic peaks in the IR. It was found that biofilms had always mineral components in the form of aluminum silicates and phosphates, and that their development is favored on nutritional materials and on the inner surface of the tubes, where there is a recirculation flow. It was also concluded that the nutritional materials, besides directly favoring the formation of biofilms on their surfaces, have an indirect influence on the growth of biofilms on other materials.

**Key Words:** Biofilm; Infrared Analysis; Aluminium silicates and Phosphates.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de formação do biofilme.....	5
Figura 2. Dispositivo utilizado para desenvolvimento do biofilme. ....	12
Figura 4. Espectro do biofilme da figura 3 após calcinação a 550 °C.....	17
Figura 5. Evolução do biofilme no interior do tubo de borracha. ....	20
Figura 6. Evolução do biofilme no interior do tubo de titânio. ....	21
Figura 7. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de matéria orgânica no interior dos tubos. ....	22
Figura 8. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de matéria orgânica na parte externa dos tubos. ....	22
Figura 9. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de água no interior dos tubos. ....	23
Figura 10. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de água no exterior dos tubos.....	23
Figura 11. Espectros do biofilme no interior dos tubos de borracha após cada análise.....	24
Figura 12. Espectros do biofilme no interior dos tubos de cobre após cada análise. ....	25
Figura 13. Espectros do biofilme no exterior dos tubos de cobre após cada análise. ....	25
Figura 14. Espectro do biofilme depositado no fundo do reservatório antes e depois da calcinação. ....	26
Figura 15. Componentes minerais do biofilme encontrado no fundo do reservatório. ....	26
Figura 16. Composição química do biofilme encontrado no fundo do reservatório. ....	27
Figura 17. Produtos de oxidação do cobre. ....	27
Figura 18. Espectro do tártaro encontrado no fundo do reservatório. ....	28
Figura 19. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de polietileno. ....	34
Figura 20. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de titânio. ....	34
Figura 21. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de aço inoxidável. ....	35
Figura 22. Evolução do biofilme no interior dos tubos de aço inoxidável.....	35
Figura 23. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de polietileno de baixa densidade. ....	36
Figura 24. Evolução do biofilme no interior dos tubos de polietileno de baixa densidade.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da água utilizada (Água do Rio Sena) .....	11
Tabela 2. Relação entre os componentes do biofilme após dois meses. ....	18
Tabela 3. Relação entre os componentes do biofilme após três meses. ....	19
Tabela 4. Relação entre os componentes do biofilme após quatro meses. ....	19
Tabela 5. Relação entre os componentes do biofilme após cinco meses. ....	19
Tabela 6. Relação entre os componentes do biofilme após seis meses. ....	20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DO BIOFILME.....	3
2.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME .....	5
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME.....	6
2.3.1 Natureza do material .....	6
2.3.2 Velocidade de escoamento e turbulência do fluido .....	7
2.3.3 Partículas inorgânicas .....	8
2.3.4 Presença de bactericidas .....	8
2.3.5 pH .....	9
2.3.6 Temperatura.....	9
2.3.7 Microorganismos constituintes .....	10
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	11
3.1 DISPOSITIVO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILMES .....	12
3.2 PRINCIPAIS VANTAGENS DO MÉTODO UTILIZADO.....	13
3.3 AMOSTRAGEM E FORMAÇÃO DE PASTILHAS .....	14
3.4 ESPECTROS DE INFRAVERMELHO.....	15
3.5 OPERAÇÕES COMPLEMENTARES .....	16
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	18
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	29
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b> .....	30
<b>ANEXOS</b> .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes podem ser encontrados em meios aquosos, desde que estes apresentem as condições necessárias para o desenvolvimento microbiológico. Logo, fatores como pH, temperatura, quantidade de nutrientes e o tipo de material são determinantes no desenvolvimento deste produto em um dado ambiente.

Encontrado com bastante frequência no dia-a-dia de milhares de pessoas, o termo biofilme permanece desconhecido fora do âmbito acadêmico e industrial, sendo muitas vezes classificado como uma simples deposição de algas. Tal classificação é bastante restrita, pois biofilmes são compostos também de vírus, substâncias inorgânicas como os alumino silicatos e/ou fosfatos e principalmente bactérias, podendo até mesmo ser isento de algas em casos onde não há exposição ao sol.

Os biofilmes podem ser tanto benéficos quanto maléficos ao ser humano, sendo então necessário seu estudo com objetivo de encontrar estratégias de forma a melhorar sua formação ou mesmo eliminá-la de acordo com as necessidades apresentadas.

Na natureza, os biofilmes apresentam normalmente um caráter benéfico, como os que se associam às raízes de plantas e lhes fornecem nutrientes. Estudos são feitos para a utilização de leitos fluidizados preenchidos com biofilmes para o tratamento de efluentes industriais, sendo estes os responsáveis pela remoção dos poluentes orgânicos da água contaminada.

A indústria agro-alimentícia utiliza biofilmes, especialmente desenvolvidos de maneira a evitar a contaminação do produto por microorganismos patogênicos, para a produção de alimentos fermentados como, por exemplo, o vinagre.

Entre os problemas práticos ligados à formação do biofilme, pode-se destacar que, apesar de todos os processos sistemáticos de limpeza/desinfecção de equipamentos, as indústrias, em especial as agro-alimentícias, são constantemente confrontadas com a presença desse material nas paredes dos equipamentos, o que pode acarretar problemas graves de saúde pública visto que estes podem induzir o acúmulo de espécies patogênicas.

Ainda no setor industrial, os biofilmes estão diretamente ligados à corrosão de materiais e à modificação do meio, acarretando em problemas de higiene e conseqüentemente

uma diminuição de qualidade do produto. A presença desse material em tubulações e equipamentos pode ocasionar também perdas de eficiência nos processos de transferência de calor, incrustações e problemas de perda de carga.

Contrariamente à maioria dos estudos feitos até o momento por biólogos e microbiologistas e especialistas em parasitologia, que caracterizam principalmente a matéria orgânica viva e inerte do biofilme, este trabalho visa analisar a porção até então pouco estudada: a parte inorgânica.

Experimentos realizados no laboratório da *École des Arts et Métiers* de Paris feitos em 2007 e 2008 mostraram que os biofilmes são ricos em depósitos minerais, podendo chegar até à 50% da sua composição total.

O objetivo principal deste trabalho é o estudo da cinética de formação do biofilme ao longo de sete meses e as influências da quantidade de nutrientes, da vazão do sistema e principalmente dos tipos de materiais: nutritivos (polietileno e borracha), não-nutritivos (titânio e aço inoxidável) e bactericidas (cobre), sobre o desenvolvimento do biofilme.

Para tanto foram recolhidas amostras de todos os materiais supracitados mensalmente e estas foram analisadas com auxílio de espectrômetros de infravermelho, devido à possibilidade de análise tanto qualitativa quanto quantitativa, antes e após a calcinação.

Análises em um microscópio eletrônico de varredura também foram realizadas visando diferenciar os alumino silicatos dos fosfatos, uma vez que ambos apresentam o mesmo pico característico nos espectros, e assim constatar quais são os componentes minerais predominantes nos biofilmes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A descoberta do termo biofilme foi feita em meados dos anos 30, porém este só ganhou uma definição científica em 1978 por John William Costerton e colaboradores, onde foram definidos como sendo populações de bactérias, aderidas umas as outras e/ou a superfícies ou interfaces, e englobadas em uma matriz. Essa definição inicial sofreu diversas mudanças ao longo do tempo devido ao avanço dos estudos nessa área, visando uma compreensão mais profunda do fenômeno de formação do biofilme.

Em 1989, Characklis definiu o biofilme como sendo uma associação de microorganismos inseridos em uma matriz de exopolímeros que são geralmente presos a superfície de todos os tipos de materiais, tais como metais, plásticos, tecidos etc. Já em 1995 Bourion os definiu como sendo uma população microbiana inserida em uma matriz fibrosa de polímeros extracelulares e imobilizada sobre uma superfície. Atualmente o biofilme é considerado como a união de micro-colônias, rodeadas por uma matriz altamente hidratada, aniônica e constituída de exopolissacarídeos (Lahaye, 2006).

### 2.1 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DO BIOFILME

Os biofilmes são constituídos principalmente por água, microorganismos, substâncias poliméricas extracelulares, partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas. (Chaves, 2004).

Os componentes inorgânicos estão inseridos nesse contexto como sendo partículas retidas, dissolvidas e adsorvidas. Os alumino silicatos e fosfatos são os minerais encontrados com mais frequência nos biofilmes e podem representar até 50% de seu volume.

A água é a fração mais significativa, variando entre 70 e 95% da massa total do biofilme (Flemming, 1993). Porém esses valores não são unânimes, outros autores publicaram em seus textos que essa relação massa de água/massa total pode ser próxima de 99% ou

mesmo atingir valores superiores (Christensen e Characklis, 1990; Neu, 1994; Azeredo e Oliveira, 2000).

Há uma grande diversidade microbiana presente nos biofilmes, sendo freqüentemente encontradas microalgas, fungos, protozoários, bactérias e até mesmo vírus. Por serem as bactérias os organismos mais versáteis, resistentes, possuindo altas taxas de reprodução, além de uma grande capacidade de adaptação, são mais abundantes e excelentes produtoras de biofilme. (Characklis *et al.*, 1990).

Os microorganismos, apesar de representarem geralmente menos de 10% da massa total do biofilme, são responsáveis pela excreção de substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do mesmo (Chaves 2004). Em 1993 Flemming propôs que as substâncias poliméricas representam de 70 a 95% em massa da matéria orgânica seca do biofilme, apresentando assim uma faixa menos abrangente que aquela proposta em 1984 por Bakke *et al.* que propuseram que esta variação poderia ser de 50 a 90%.

Tais substâncias poliméricas, denominadas exopolissacarídeos, são responsáveis pela determinação da integridade funcional assim como da estrutura dos biofilmes, além de possuir um papel de barreira defensiva, evitando que as células sofram com o arraste provocado pelo fluxo e proporcionando uma maior resistência ao meio onde estão inseridos. São estas substâncias que permitem uma maior resistência aos estresses que o meio pode causar como, por exemplo, a diminuição e até mesmo a escassez de nutriente por um determinado período, a presença de biocidas, mudanças ambientais e de pH, entre outros. (Caixeta, 2008; Boari, 2008).

A espessura do biofilme está diretamente ligada à composição química do meio e da sua hidrodinâmica. Na indústria de papel estes apresentam espessuras entre 5 a 10 mm, pois estão em um meio altamente nutritivo. Porém em sistemas de águas purificadas onde a presença de nutrientes é restrita como, por exemplo, nas tubulações de redes de distribuição, os biofilmes apresentam espessuras muito inferiores, atingindo apenas algumas centenas de micrômetros, e na maioria dos casos não cobrem totalmente a superfície (Chaves, 2004; van der Wende e Characklis, 1990).

## 2.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME

Juntamente com umas das primeiras definições de biofilmes, Marshall *et al.* propuseram em 1971 que a formação do biofilme se dava em duas etapas somente, uma primeira reversível seguida por uma etapa irreversível. Na primeira etapa, devido às forças de Van der Waals, atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas, aconteceria à adesão dos microorganismos na superfície dos materiais. Esta etapa é dita reversível, pois as bactérias apresentam movimento browniano e podem ser facilmente removidas por rinsagem (Caixeta, 2008).

Ainda nesse contexto, na segunda etapa as interações tornam-se mais fortes, do tipo dipolo-dipolo, ligações iônicas e covalentes e pontes de hidrogênio, havendo então a ligação das células bacterianas ao substrato através de fimbrias poliméricas. Nesse ponto já há a produção dos exopolissacarídeos pelas bactérias e a remoção do biofilme torna-se mais difícil, sendo necessária a utilização de formas mecânicas como raspagens ou lavagens (Caixeta, 2008).

Capelleti em 2006 atualizou a teoria proposta por Christensen e Characklis (1990) e propôs que a formação do biofilme ocorreria de acordo com a seqüência de eventos apresentados na Figura 1. É possível observar que o desenvolvimento do biofilme acontece de acordo com as etapas de adesão (adsorção e imobilização) e adaptação (consolidação e colonização) dos microorganismos à superfície do material.

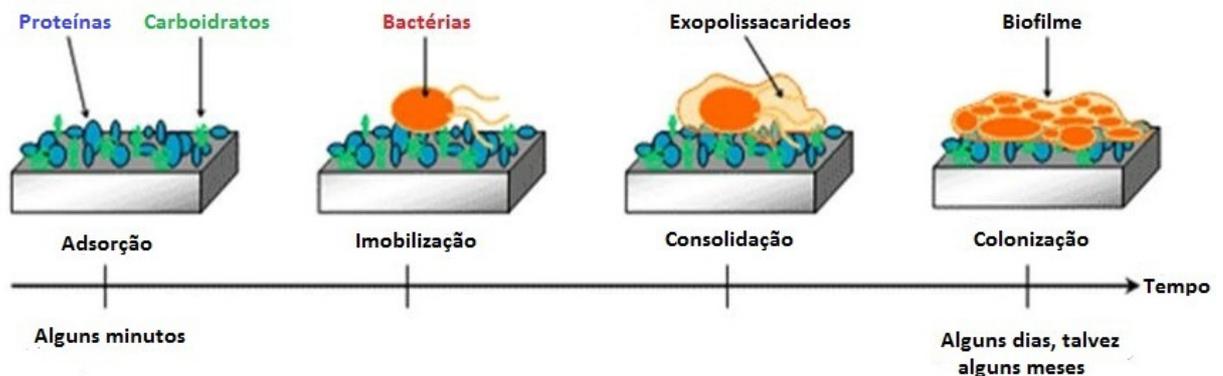


Figura 1. Esquema de formação do biofilme.

As quatro etapas de formação podem ser descritas como:

- Adsorção: É uma etapa praticamente instantânea. Nessa etapa ocorrem as modificações físico-químicas da superfície de modo a favorecer a adesão dos microorganismos (Hotchet *et al.*, 2008).

- Imobilização (adesão reversível) e Consolidação (adesão irreversível): Acontecem de acordo com a teoria estabelecida por Marshall *et al.* (1971) e atualizada por Caixeta (2008) descrita nos dois primeiros parágrafos desta seção.

- Colonização: Representa a etapa lenta de reação, podendo durar desde algumas horas até alguns meses em função das condições onde se encontram os microorganismos. Uma vez que os estes estão aderidos à superfície sólida, eles são capazes de produzir exopolissacarídeos, e então se reproduzem no interior da matriz formada. É essa colonização que proporciona a formação do biofilme propriamente dito (Hotchet *et al.*, 2008).

## 2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

### 2.3.1 Natureza do material

Os materiais podem ser divididos em três tipos de acordo com a sua natureza: Materiais ferrosos, concretos e cimentos além dos materiais orgânicos. Os materiais ferrosos são mais propícios a corrosão, em virtude de tal fato o uso de chumbo e cobre é bastante restrito nas tubulações de abastecimento público e mesmo de tubulações internas de construções, sendo mesmo proibida em alguns países a utilização desses materiais (Besner, 1990).

Os materiais orgânicos como, por exemplo, o PVC e o polietileno surgiram como alternativa à substituição dos materiais ferrosos no que diz respeito a tubulações de abastecimento. Esses materiais apresentam vantagens ligadas à facilidade de instalação e manipulação, além da sua durabilidade e baixo custo (Besner, 1990).

No entanto, estes últimos apresentam uma considerável permeabilidade quando expostos a moléculas orgânicas tais como solventes, hidrocarbonetos, fenóis, dentre outros, o que pode ocasionar uma contaminação da água além de servirem como fonte de nutrição à flora bacteriana presente no meio. Os nutrientes podem ser também originários de compostos de base existentes na estrutura desses materiais orgânicos como, por exemplo, impurezas (Sadiki *et al.*, 1996).

Chandra *et al.* demonstraram em 2001 que a natureza do material que servirá como suporte para a formação do biofilme afeta a sua formação. Uma comprovação dessa afirmativa foi obtida por Lethola *et al.* (2004, 2005) que constataram um maior acúmulo de biofilme em tubos de polietileno em relação aos tubos de cobre.

### 2.3.2 Velocidade de escoamento e turbulência do fluido

A turbulência do fluido, que é diretamente proporcional a velocidade de escoamento do fluido, possui grande influência no crescimento e na estabilidade do biofilme. O transporte de nutrientes, a adesão e o desprendimento dos microrganismos são completamente dependentes do contato que o fluido tem com a superfície sólida, sendo então afetados com a mudança de velocidade de escoamento (Machado, 2005; Pereira, 2001).

Em baixas velocidades há uma maior resistência a transferência de nutrientes e oxigênio do meio para os microorganismos que estão aderidos na forma de biofilme, logo o crescimento deste material é prejudicado (Pereira, 2001).

Um aumento da velocidade de escoamento proporcionará uma melhor transferência de massa, o que beneficia o crescimento biológico, porém aumenta também as forças cisalhantes, que ocasionam o desprendimento de partes do biofilme e uma conseqüente redução da biomassa aderida à superfície. Vale salientar que biofilmes menos espessos favorecem o transporte de nutrientes (Machado, 2005).

Além de interferir na transferência de massa, a variação de velocidade também possui influências no modo de colonização das superfícies. Baixas velocidades favorecem a formação de colônias isoladas às superfícies, enquanto velocidades mais elevadas propiciam uma adesão de grandes grupos de células, raramente isoladas (Chaves, 2004).

### 2.3.3 Partículas Inorgânicas

Partículas encontradas no meio circundante podem ser incorporadas ao biofilme e acarretar mudanças na sua estrutura, sendo responsáveis por mudanças na estabilidade do produto. De acordo com as partículas que são adsorvidas e com os microorganismos presentes os biofilmes podem se tornar mais ou menos resistentes aos estresses provocados pelo meio no qual está inserido. Logo, a incorporação de partículas inorgânicas pode tanto aumentar quanto diminuir o crescimento e a estabilidade do biofilme (Pereira, 2001).

### 2.3.4 Presença de bactericidas

A desinfecção consiste em uma operação que permite eliminar microorganismos e/ou inativar vírus indesejáveis presentes no meio inerte contaminado. Essa operação tem como função principal limitar ao máximo os microorganismos presentes no sistema (Boutaleb, 2007).

A utilização de um desinfetante no tratamento da água visa torná-la potável do ponto de vista bacteriológico, não tendo como objetivo eliminar todos os organismos vivos presentes, mas sim garantir que não haja a presença de organismos patogênicos.

Rizet *et al.* (1984) e Maul *et al.* (1985) constataram que a presença de cloro livre residual na água oriunda dos sistemas de abastecimento público diminui o número de bactérias livres cultiváveis dificultando, assim o desenvolvimento do biofilme.

### 2.3.5 pH

Os microorganismos possuem valores limites de pH que possibilitam a sua sobrevivência, assim como uma faixa de pH ótimo que favorece o seu crescimento. Estes podem ser classificados, de acordo com os valores de pH, em três grupos: acidófilos, neutrófilos e basófilos (Stanier *et al.*, 1995).

Grande parte dos biofilmes encontrados na natureza se desenvolvem principalmente em meios que apresentam pH próximos ao neutro. Desvios positivos e negativos do pH ótimo de crescimento afetam o desenvolvimento do biofilme (Bott, 1995).

Além de possuir um efeito preponderante no metabolismo de microorganismos, o pH também afeta as propriedades superficiais de sólidos, o que pode proporcionar uma maior ou menor repulsão eletrostática, causando então uma interferência na adesão dos microorganismos às superfícies (Boutaleb, 2007).

### 2.3.6 Temperatura

Valores elevados de temperatura podem ocasionar a desnaturação das proteínas que compõe os microorganismos, logo o limite máximo de temperatura corresponde ao valor nos quais esses efeitos destrutivos são preponderantes (Stanier *et al.*, 1995).

A temperatura ótima de um sistema corresponde ao valor onde há uma máxima taxa de crescimento dos microorganismos. Temperaturas abaixo da ótima provocam uma redução gradativa da taxa de crescimento até um valor limite onde o crescimento cessa (temperatura mínima). Cada microorganismo possui valores específicos de temperatura mínima, máxima e ótima (Chaves, 2004).

### 2.3.7 Microrganismos constituintes

Microorganismos que apresentam maior mobilidade, proveniente da presença de flagelos, por exemplo, podem se fixar mais facilmente, ou não, ao suporte. O alto poder de adaptação e a capacidade de produção de exopolissacarídeos são fatores que também podem favorecer a adesão dos microorganismos as superfícies sólidas (Boutaleb, 2007). A formação desses polissacarídeos costuma atingir seu valor máximo em períodos de estresse (Bourion, 1995).

A idade da cultura também possui um papel importante no desenvolvimento do biofilme. Stanley (1983) mostrou a adesão de *P. aeruginosas* é melhor na fase exponencial de crescimento do que na fase estacionária. Contrariamente a esse resultado, Little *et al.* (1986) constatou que *P. marina* é mais hidrofóbica na sua fase estacionária, sendo então melhor a adesão ao suporte nessa fase em comparação com a fase exponencial.

### 3 METODOLOGIA

O ponto de alimentação era proveniente da linha de abastecimento público de Paris, sem nenhum tratamento prévio e nem aquecimento de água no inverno. Os valores que caracterizam a água utilizada podem ser observados abaixo na Tabela 1.

As análises foram feitas durante sete meses, começando em Novembro de 2009 e terminando Junho de 2010. Nesse período a água sofreu variações de temperatura e, por conseqüência, de todas as suas propriedades, sendo então os valores representados pelas as médias aritméticas das mesmas nesse período.

Tabela 1. Parâmetros da água utilizada (Água do Rio Sena)

Parâmetro	Água do Rio Sena
Temperatura (°C)	25,4
Condutividade Elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) à 25 °C	516
pH	7,63
Turbidez (NFU)	0,15
Alcalinidade Total (graus F)	18,5
Cálcio (mg/L)	92,0
Magnésio (mg/L)	3,2
Sódio (mg/L)	7,7
Potássio (mg/L)	2,4
Hidrogeno carbonato (mg/l)	226,0
Sulfato (mg/L)	20,0
Cloro (mg/L)	23,0
Nitrato (mg/L)	30,0
Carbono orgânico total (COT) (mg/L)	0,4

### 3.1 DISPOSITIVO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Com o objetivo de obter biofilmes formados em mesmas condições de escoamento, foi utilizado um reservatório de 400 L, com vazões de entrada e saídas iguais e correspondentes a 1,85 L/h. O sistema era composto de 12 tubos de 10 cm de comprimento montados em série pelos quais circulava água (circuito semi-aberto) em uma vazão regulada pela bomba de recirculação igual a 368 L/h. Todos os tubos estavam completamente imersos no reservatório de tal forma que fosse possível obter biofilmes a partir de água em regime praticamente estacionário na parte externa dos tubos e biofilmes em água circulante no interior destes (ver figura 2).

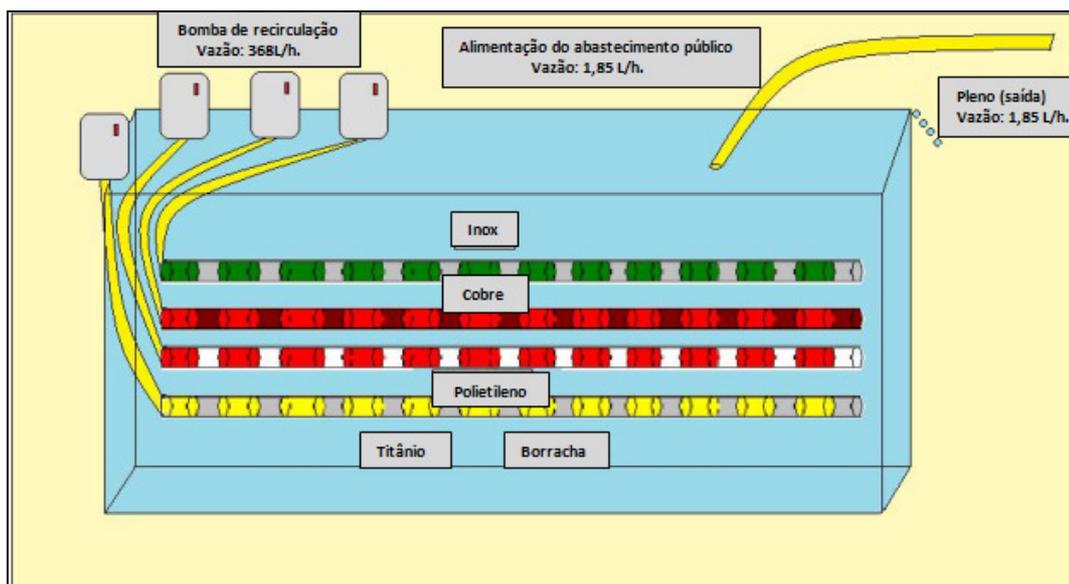


Figura 2. Dispositivo utilizado para desenvolvimento do Biofilme.

Os tubos usados, de diâmetro de meia polegada, eram de diferentes tipos de materiais: borracha/polietileno, polietileno de baixa densidade (BD), aço inoxidável, titânio e cobre. Foram utilizados os tubos de dupla camada (externa de borracha e interna de polietileno) e os de polietileno de BD para observar a evolução do biofilme em materiais nutritivos. Já os tubos de aço inoxidável e titânio foram utilizados para conhecer sua formação em materiais algumas vezes inerte em termos de corrosão, mas também nutritivos e não tóxicos aos microorganismos. Por fim, o cobre foi escolhido por este possuir um efeito

considerado bactericida que, através de análises, apresenta interferências provindas dos produtos de corrosão que diminui consideravelmente as colonizações.

Todo o dispositivo foi isolado em uma sala sem presença de luz e fechada ao público, evitando assim a formação de algas e interferências humanas.

O início das manipulações foi no dia 24/11/2009. Foi determinado que as análises fossem feitas mensalmente em todos os tubos já mencionados anteriormente, logo o projeto apresenta o estudo da evolução do biofilme em dez situações distintas, considerando a parte interna e externa dos tubos como sendo situações diferentes.

### 3.2 PRINCIPAIS VANTAGENS DO MÉTODO UTILIZADO

A espectroscopia de infravermelho não consegue, por ela mesma, diferenciar os compostos orgânicos dos inorgânicos, sendo capaz apenas de registrar os movimentos (vibração, por exemplo) dos átomos em relação aos outros. O importante desse método é que as informações de cada composto são encontradas separadamente, pois a frequência é dependente da massa dos átomos assim como do tamanho das ligações. De maneira geral, os grupamentos de átomos aumentam a partir da banda de IR mais próxima para as bandas mais distantes, ou seja, de  $\lambda = 2,5 \mu\text{m}$  até  $50 \mu\text{m}$  em comprimento de onda, ou ainda (considerando  $1/\lambda$ ) de  $4.000$  a  $200 \text{ cm}^{-1}$  em número de onda ( $\nu^*$ ).

Esquemáticamente, os grupos O-H são os primeiros a aparecerem entre  $4.000$  e  $3.000 \text{ cm}^{-1}$ , seguidos das ligações orgânicas (principalmente entre  $3.000$  e  $1.000 \text{ cm}^{-1}$ ), depois pelos grupos  $\text{CO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{SiO}_4$  de  $1.550$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$ , e por fim os óxidos e oxi-hidróxidos metálicos entre  $600$  e  $200 \text{ cm}^{-1}$ .

Além disso, essa técnica leva em consideração a simetria dos grupos atômicos e da rede cristalina, o que permite a distinção das variedades alotrópicas de um mesmo composto químico. Por exemplo, o carbonato de cálcio  $\text{CaCO}_3$  fornece bandas de absorção

diferentes de acordo com a sua forma amorfa e muito hidratada ou, mais classicamente, sob forma de calcita, aragonita ou vaterita.

Fugindo de uma análise qualitativa, as medidas quantitativas também são possíveis, sendo interessante o conhecimento das quantidades de matéria coletadas. Tais informações são encontradas em documentos ao fim de cada análise do espectro, mas é necessário um conhecimento mais aprofundado para extraí-lo com maior precisão. O princípio é simples, pois após a “moagem” da amostra juntamente com o brometo de céσιο (transparente no infravermelho) que serve como dispersante, a mistura é comprimida de maneira a formar uma pastilha cuja área apresentada no infravermelho seja constante. Nessas condições as absorbâncias são aditivas e, para um grupamento dado, a absorbância  $A$  é proporcional a massa  $m$  do grupo presente na pastilha. Este princípio é notadamente dependente da qualidade dos espectros obtidos e da habilidade manual do operador.

### 3.3 AMOSTRAGEM E FORMAÇÃO DE PASTILHAS

Para obter um espectro representativo do biofilme estudado foi necessário se fazer a coleta das amostras de forma rigorosa. A primeira operação consiste em uma lavagem do biofilme com água de-ionizada de forma a evitar ao máximo a contaminação pela água de alimentação onde o sistema está submerso e os sais que ela possui. Uma secagem moderada, por evaporação à temperatura ambiente (ou em um vaporizador até no máximo 60°C), é suficiente para eliminar o excesso de umidade sem desnaturar o produto a ser analisado.

A segunda operação consiste da coleta propriamente dita. Uma vez que o biofilme é abundante, pode-se utilizar uma técnica de micro-abrasão com auxílio de pequenos equipamentos de aço inoxidável. Caso este seja invisível a olho nu, o procedimento é feito por contato: brometo de céσιο em pó fino é friccionado contra a superfície e se torna uma amostra enriquecida pelo biofilme, podendo ser assim analisado.

O processo de formação de pastilhas inicia-se pela pesagem do biofilme (em média de 10 à 100  $\mu\text{g}$ ) com auxílio de uma balança automática ao  $\mu\text{g}$ . Em seguida tem-se o processo de moagem durante um período pré-estabelecido em 10 minutos na presença do brometo de cézio (23 +/- 2 mg para uma pastilha de 5 mm de diâmetro). Essa moagem é feita em um pequeno suporte em argamassa com extremidade em alumínio mono-cristalino ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) incolor. Este processo é indispensável para obter espectros infravermelhos mais longos (até 200  $\text{cm}^{-1}$ ).

Após todos esses procedimentos a amostra está pronta para ser compactada e assim formar a pastilha que será analisada no infravermelho. A compactação da amostra é feita com auxílio de um molde apropriado de 5 ou 3 mm de diâmetro que será posto em uma prensa hidráulica.

### 3.4 ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

As pastilhas são analisadas em um espectrômetro Perking-Elmer à transformada de Fourier, com uma resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e com capacidade de acumulo de 120 espectros (condições de rotina). Todos os espectros são arquivados em modo absorbância fornecendo assim uma escala linear para as análises quantitativas. O aparelho é equipado de um sistema de redução do trajeto óptico no ar com objetivo de minimizar as perturbações ligadas ao ar ambiente (umidade,  $\text{CO}_2$ ). A figura 3 fornece um exemplo de espectro obtido nesse projeto.

No espectro a seguir, formado na superfície do polietileno, pode-se observar a água residual da hidratação do biofilme (O-H), as bandas de matéria orgânica (ligações C-H, em 2950  $\text{cm}^{-1}$ ) e as bandas Amina I e II das proteínas, características de uma atividade biológica. Pode-se observar também a presença de minerais: carbonato de cálcio sob a forma de calcita (C) e aluminossilicatos ( $\text{SiO}_4$ ).

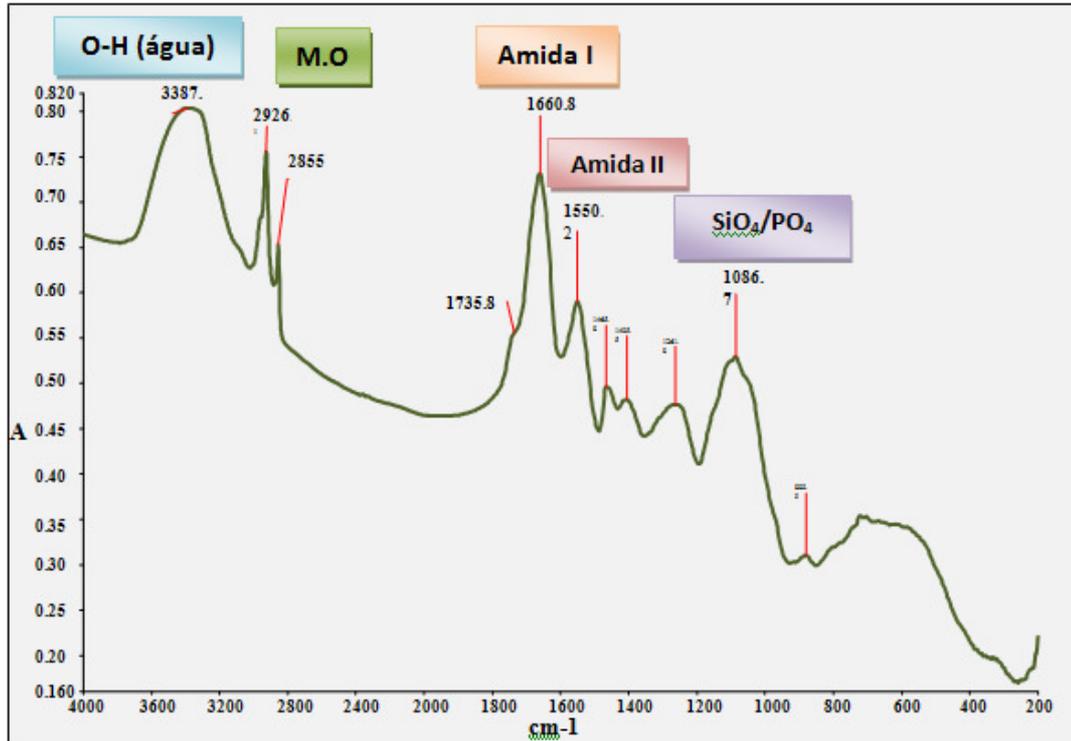


Figura 3. Espectro do biofilme encontrado no interior do tubo de borracha.

### 3.5 OPERAÇÕES COMPLEMENTARES

As análises dos espectros podem gerar diversas dificuldades, pois podem existir interferências entre as bandas de absorção de outros produtos. A fim de evitar tais interferências podemos, após a primeira análise, moer mais uma vez a amostra e após calciná-la a uma temperatura apropriada. Essa calcinação tem como objetivo a transformação de uma substância pouco visível no infravermelho em outra que absorve com mais clareza (por exemplo, sulfetos que se transformam em sulfatos), ou simplesmente pela eliminação de matéria orgânica.

Existem duas temperaturas que são usadas com mais frequência nesse processo:

- Calcinação à “baixa temperatura” a 550 °C.
- Calcinação à “alta temperatura” a 1100 °C.

Para conferir uma maior precisão no procedimento, o forno deve ser pré-aquecido já na temperatura da calcinação. A amostra vai ao forno durante uma hora em um pequeno recipiente de ouro previamente limpo e este por sua vez está protegido por um cadinho de porcelana. Os utensílios de compactação devem ser igualmente pré-aquecidos a uma temperatura de 50 °C para evitar quedas de temperaturas ainda mais bruscas e assim o acúmulo de água (ambiente) na amostra.

Nas calcinações a 1100 °C devemos utilizar um pequeno recipiente em platina no lugar do de ouro, devido à possibilidade de fusão do recipiente o que interferiria na análise. Vale salientar também, que após a calcinação a massa da amostra diminui consideravelmente, o que requer maiores cuidados com o manuseio (matéria orgânica e brometo de cério desaparecem da amostra) e sendo necessária a compactação em um molde de 3 mm de diâmetro.

Como já mencionado anteriormente, a amostra é reconstituída em forma de pastilha que será analisada nas mesmas condições no espectrômetro de infravermelho. A perda de matéria devido ao transporte e manuseio durante a calcinação é limitada a 1%. Pode-se observar, na figura 4, o espectro do resíduo mineral do biofilme da figura 3.

Mesmo após a calcinação ainda encontramos água em baixa quantidade (água atmosférica acumulada por higroscopia no momento do transporte da amostra e de sua compactação), a calcita (C) e os alumino silicatos ( $\text{SiO}_4/\text{PO}_4$ ).

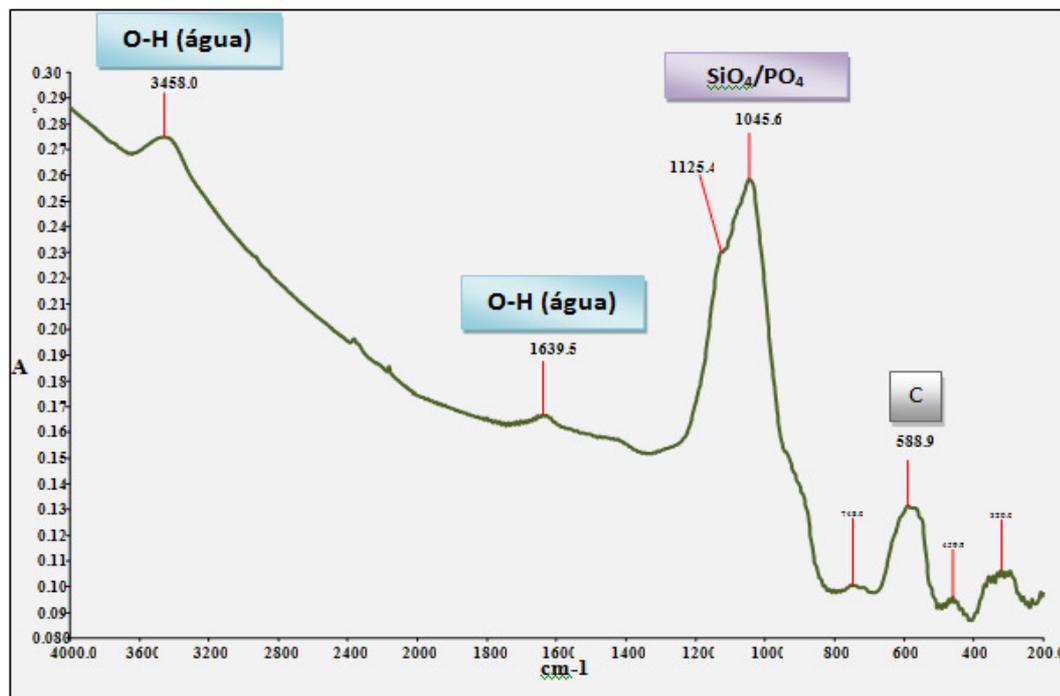


Figura 4. Espectro do Biofilme da figura 3 após calcinação a 550 C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As primeiras análises foram feitas dois meses após o dispositivo ter sido montado e colocado em regime permanente, de modo a continuar os projetos dos anos anteriores, que já tinham feito análises de cinética de formação do biofilme, em condições similares.

O software do analisador de infravermelho nos permitiu fazer uma relação entre todos os componentes do biofilme a partir da diferença de absorbâncias (picos) presente em cada espectro. Os resultados obtidos estão expostos nas tabelas a seguir (Tabelas de 2 a 6).

Analisando todas as tabelas vemos que a quantidade de alumínio silicato e/ou fosfato, que começa baixa com relação aos outros componentes, mostra um crescimento considerável ao longo do tempo. Vale salientar também, que a borracha e o polietileno facilitam a formação do biofilme (mais nutritivos que os outros).

Não foi possível fazer o mesmo estudo para o cobre, pois devido ao seu efeito considerado bactericida não permite a formação do biofilme. No entanto este apresenta uma enorme quantidade de produtos de corrosão na sua superfície (Figuras 12 e 13).

Tabela 2. Relação entre os componentes do biofilme após dois meses.

	M.O/água	Amidal/água	Al.Silicato/água	M.O/Al.Silicato	Al.Silicato/Amidal
<b>Borracha - 70j</b>	0,73	1,50	0,27	2,67	0,18
<b>PE(ext) - 70j</b>	0,71	1,50	0,63	1,12	0,42
<b>Titânio(int) - 70j</b>	0,38	0,82	0,52	0,73	0,64
<b>Titânio(ext) - 70j</b>	0,68	1,29	0,57	1,21	0,44
<b>PE BD(int) - 77j</b>	0,63	0,80	0,40	1,56	0,51
<b>PE BD(ext) - 77j</b>	0,82	1,51	0,49	1,67	0,33
<b>Inox(int) - 78j</b>	0,45	1,20	0,47	0,97	0,39
<b>Inox(ext) - 78j</b>	0,39	0,61	0,36	1,10	0,59

Tabela 3. Relação entre os componentes do biofilme após três meses.

	M.O/água	Amidal/água	Al.Silicato/água	M.O/Al.Silicato	Al.Silicato/Amidal
<b>Borracha - 99j</b>	0,78	1,56	0,45	1,75	0,29
<b>PE(ext) - 99j</b>	0,77	1,51	0,57	1,35	0,38
<b>Titânio(int) - 99j</b>	0,47	1,18	0,84	0,56	0,71
<b>Titânio(ext) - 99j</b>	0,60	0,81	0,59	1,02	0,73
<b>PE BD(int)- 100j</b>	0,52	0,75	0,30	1,73	0,40
<b>PE BD(ext)- 100j</b>	0,65	0,98	0,39	1,65	0,40
<b>Inox(int) - 101j</b>	0,48	1,17	0,50	0,96	0,43
<b>Inox(ext) - 101j</b>	0,40	0,74	0,63	0,63	0,85

As tabelas 4 e 5 mostram uma grande variação da relação entre os componentes no exterior do polietileno de baixa densidade e do aço inoxidável, que pode ser ligado a uma má manipulação dos tubos no momento da coleta dos mesmo ou a um possível depósito de biofilme proveniente de outros materiais (percebemos um depósito de biofilme no fundo do reservatório originados pelo desprendimento destes do exterior dos tubos mais nutritivos).

Tabela 4. Relação entre os componentes do biofilme após quatro meses.

	M.O/água	Amidal/água	Al.Silicato/água	M.O/Al.Silicato	Al.Silicato/Amidal
<b>Borracha - 130j</b>	0,76	1,54	0,56	1,36	0,36
<b>PE(ext) - 130j</b>	0,70	1,56	0,62	1,14	0,40
<b>Titânio(int)-130j</b>	0,49	1,05	0,67	0,73	0,64
<b>Titânio(ext)-130j</b>	0,57	0,85	0,46	1,25	0,54
<b>PE BD(int) - 130j</b>	0,68	1,44	0,69	0,98	0,48
<b>PE BD(ext) - 130j</b>	1,18	1,88	0,44	2,67	0,24
<b>Inox(int) - 131j</b>	0,46	1,20	0,63	0,73	0,52
<b>Inox(ext) - 131j</b>	1,02	1,20	1,79	0,57	1,49

Tabela 5. Relação entre os componentes do biofilme após cinco meses.

	M.O/água	Amidal/água	Al.Silicato/água	M.O/Al.Silicato	Al.Silicato/Amidal
<b>Borracha-164j</b>	0,82	1,53	0,66	1,24	0,43
<b>PE (ext) -164j</b>	0,79	1,54	0,64	1,23	0,42
<b>Titânio(int)-164j</b>	0,69	1,14	0,49	1,41	0,43
<b>Titânio(ex)-164j</b>	0,71	0,85	0,85	0,84	1,01
<b>PE BD(int) -165j</b>	0,66	1,41	0,92	0,71	0,65
<b>PE BD(ext) -165j</b>	1,16	1,94	0,50	2,33	0,26
<b>Inox(int) -170j</b>	0,50	1,10	0,47	1,06	0,42
<b>Inox(ext) -170j</b>	0,35	0,75	0,50	0,70	0,66

Ao longo do último mês de análise, percebemos que todo o material formado no exterior da borracha tinha se descolado e esse fato pode ser percebido pela diminuição da relação entre os seus componentes. Não foi percebida nenhuma grande variação nos outros tubos com relação aos meses anteriores.

Tabela 6. Relação entre os componentes do biofilme após seis meses.

	M.O/água	Amidal/água	Al.Silicato/água	M.O/Al.Silicato	Al.Silicato/Amidal
<b>Borracha-200j</b>	0,64	1,26	0,56	1,13	0,45
<b>PE (ext) -200j</b>	0,86	1,48	0,45	1,89	0,31
<b>Titânio(int)-200j</b>	0,62	1,20	0,62	0,99	0,52
<b>Titânio(ex)-200j</b>	0,51	1,04	0,87	0,59	0,83
<b>PE BD(int) -201j</b>	0,56	1,34	1,04	0,53	0,78
<b>PE BD(ext) -201j</b>	1,16	1,54	0,47	2,44	0,31
<b>Inox (int) -202j</b>	0,65	1,08	1,30	0,50	1,20
<b>Inox (ext) -202j</b>	1,26	0,73	1,40	0,90	1,91

A figura 5 representa graficamente as relações entre todos os outros componentes do biofilme e a água ao longo do tempo para a parte interior dos tubos de borracha. Sendo este um material nutritivo, pode-se perceber desde a primeira análise a quantidade de biofilme já era bastante significativa e que esta se mantém praticamente constante ao longo do tempo.

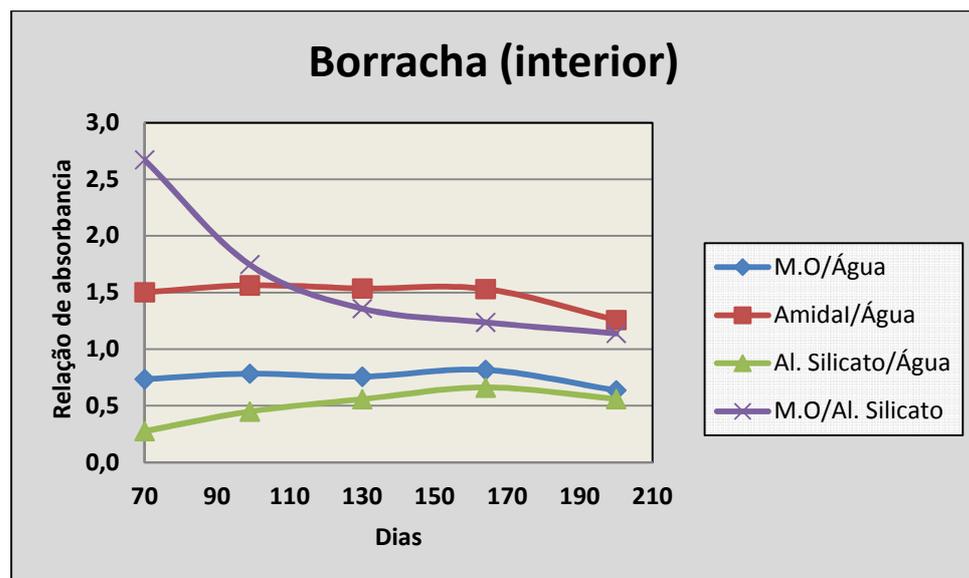


Figura 5. Evolução do biofilme no interior do tubo de borracha.

Com o objetivo de permitir uma comparação entre materiais nutritivos e não-nutritivos, é possível ver na figura 6 as mesmas relações da figura precedente, mas agora para o interior dos tubos de titânio. A linearidade encontrada para a borracha não é encontrada nesse caso, porém podemos considerar as variações muito pequenas ao longo do tempo. Outro ponto importante a ressaltar é que para este material é possível dizer que na segunda análise (99 dias) se encontram as maiores concentrações de alumínio silicato e/ou fosfato.

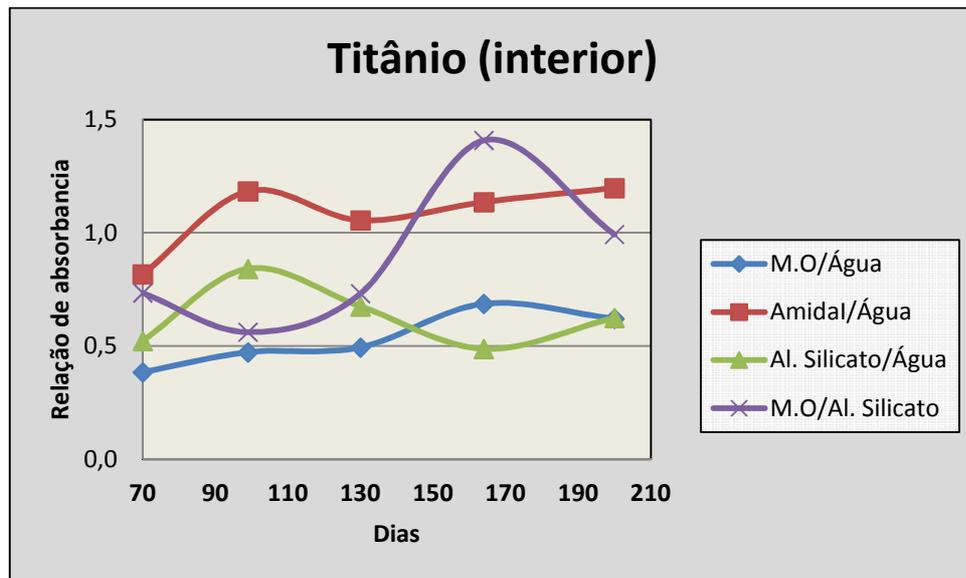


Figura 6. Evolução do biofilme no interior do tubo de titânio.

O gráfico a seguir (figura7) mostra a relação entre os componentes minerais (alumínio silicato e/ou fosfato) e a matéria orgânica no interior de cada tubo. Ele permite verificar que os materiais nutritivos (borracha e polietileno) possuem comportamentos similares, ou seja, ambos apresentam um crescimento relativo de matéria orgânica com relação à parte mineral. Percebe-se a mesma similaridade com os materiais não nutritivos (inox e titânio), porém estes são mais instáveis que os anteriores e apresentam um ponto de máximo durante a quarta análise (165 dias).

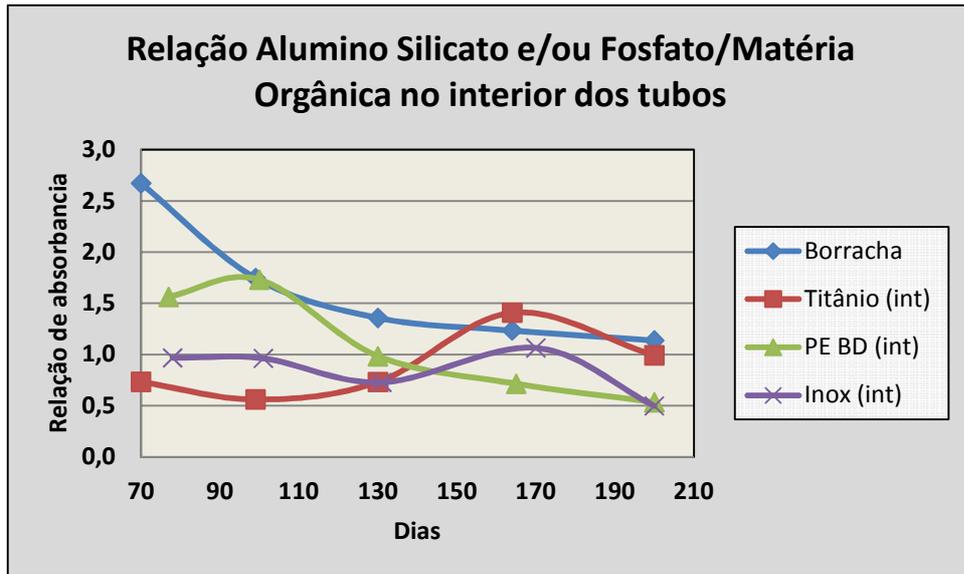


Figura 7. Relação entre a quantidade de alumínio silicato e/ou fosfato e de matéria orgânica no interior dos tubos.

Em seguida, foi feita a mesma análise para a parte externa dos mesmos tubos supracitados (figura 8). Os resultados, nesse caso, não possuem o mesmo grau de fiabilidade do caso anterior, pois durante os experimentos ocorreram alguns problemas de manipulação dos tubos que podem comprometer a análise. Contrariamente aos resultados obtidos para a parte interna, na parte externa a similaridade de comportamentos está entre o polietileno de baixa densidade e o titânio, onde ambos apresentam um máximo durante a terceira análise (130 dias), e entre o polietileno e o inox, que apresentam um crescimento a partir da segunda análise (99 dias).

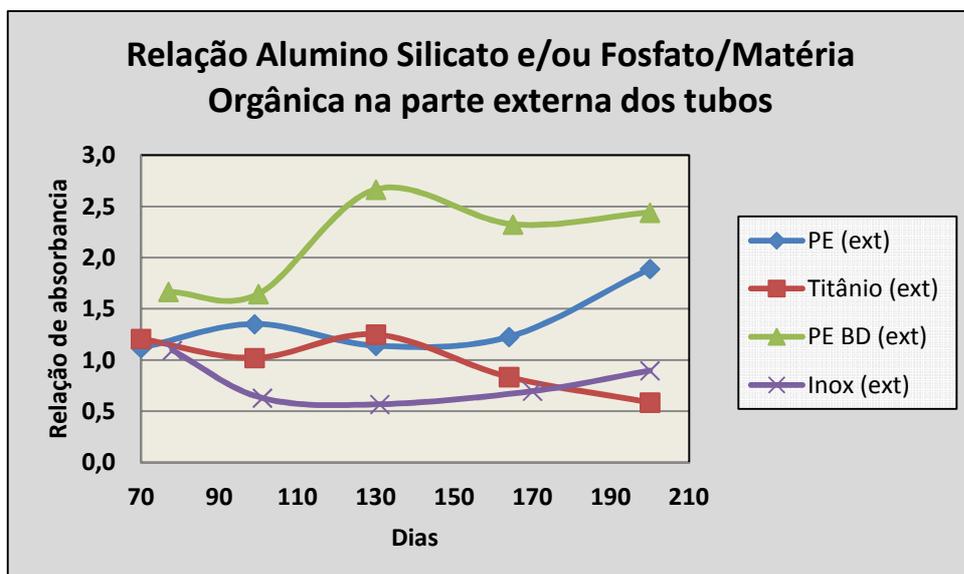


Figura 8. Relação entre a quantidade de alumínio silicato e/ou fosfato e de matéria orgânica na parte externa dos tubos.

As relações entre a matéria orgânica e os outros componentes não são suficientes para garantir a presença do biofilme, pois ela pode estar ligada a poluição clássica (ar, má manipulação das amostras). No entanto, tendo-se também a presença da banda de Amida I, que representa as proteínas presentes em todos os seres vivos, pode-se garantir sua presença.

Nas duas próximas figuras (figuras 9 e 10) observa-se, respectivamente, as relações entre os componentes minerais e a banda Amida I no interior e no exterior de todos os tubos analisados. A partir dessas análises pode-se concluir que a parte orgânica encontrada não vem inteiramente da poluição clássica, mas a maioria é proveniente da presença de biofilme.

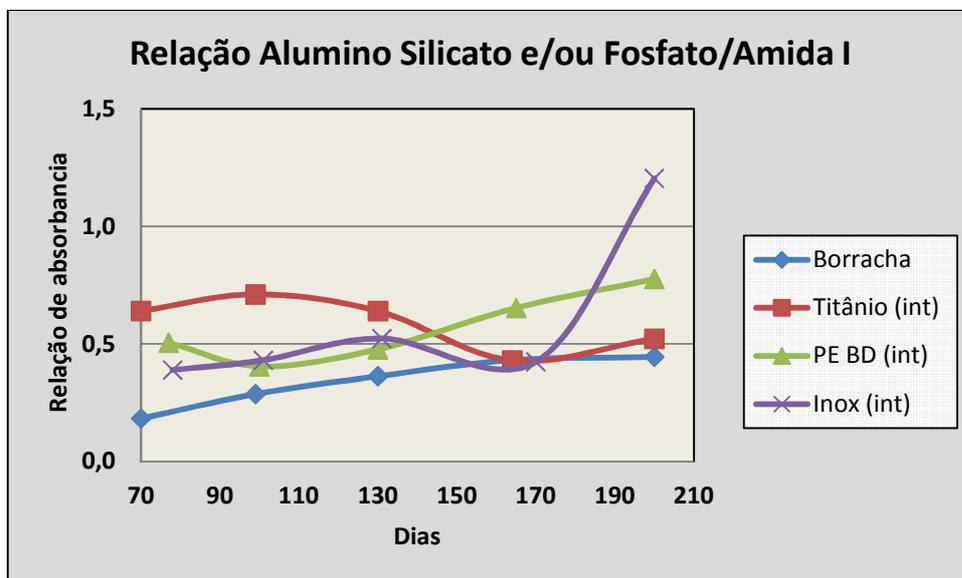


Figura 9. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de água no interior dos tubos.

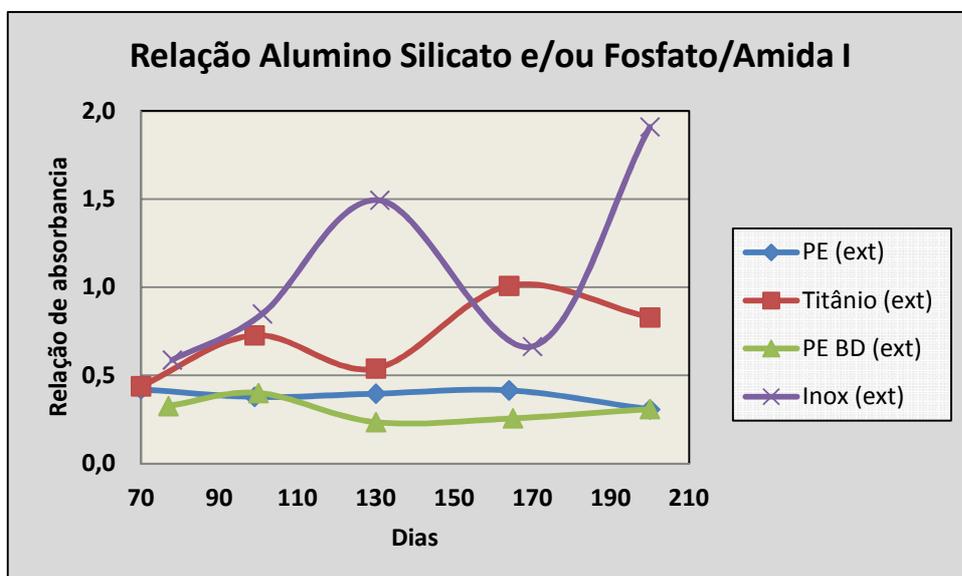


Figura 10. Relação entre a quantidade de alumino silicato e/ou fosfato e de água no exterior dos tubos.

Na figura 11 estão representados todos os espectros de cada análise feita ao longo do tempo para a borracha, o que permite uma visualização mais clara da relação entre os componentes a partir da intensidade dos seus picos correspondentes. Sendo a borracha um material nutritivo, seus espectros servem como exemplo para a cinética de formação do biofilme em condições favoráveis.

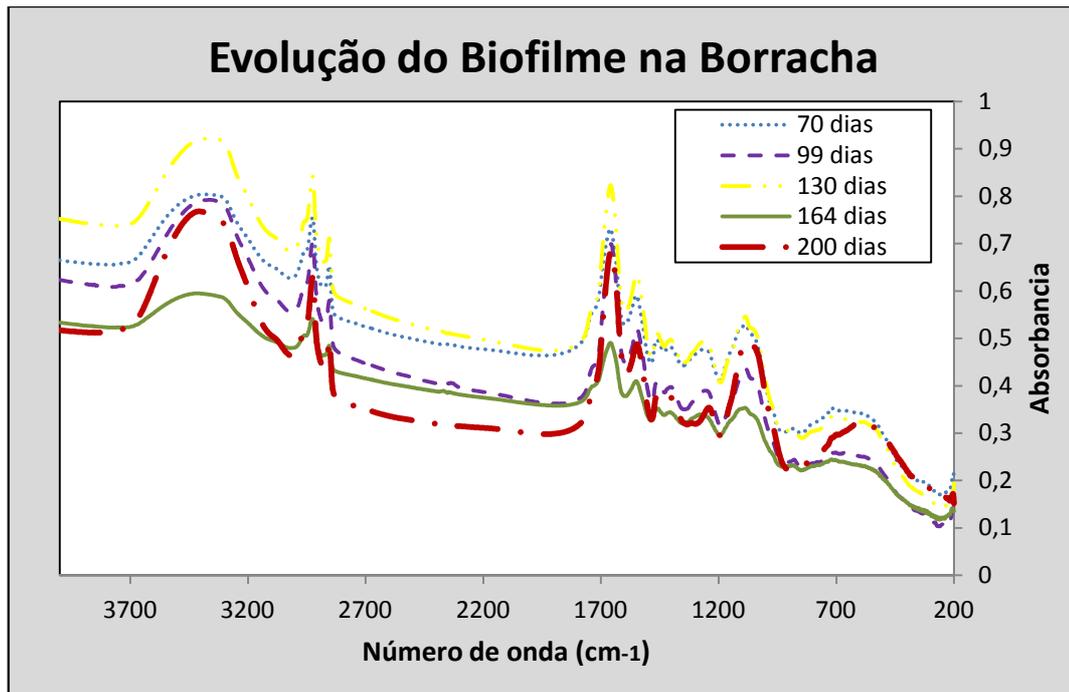


Figura 11. Espectros do biofilme no interior dos tubos de borracha após cada análise.

Conhecendo-se os picos característicos de cada componente, pode-se analisar também os espectros da evolução do biofilme no interior e exterior dos tubos de cobre (figuras 12 e 13). Em nenhum dos dois casos, nem no interior nem no exterior dos tubos, é possível garantir a presença do biofilme, pois os picos de matéria orgânica são muito fracos, podendo ser ligados somente a poluição clássica, e os picos das bandas Amida I e Amida II estão mascarados pela presença de produtos de corrosão do cobre ( $\text{CuO}$ ,  $\text{CuO}_2$ ).

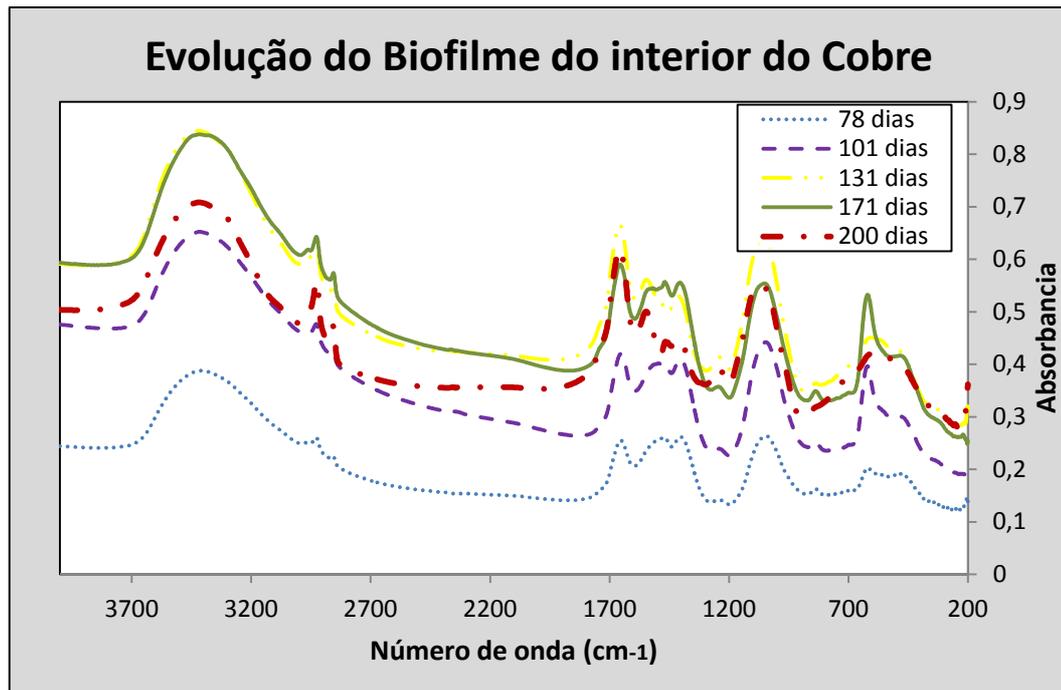


Figura 12. Espectros do biofilme no interior dos tubos de cobre após cada análise.

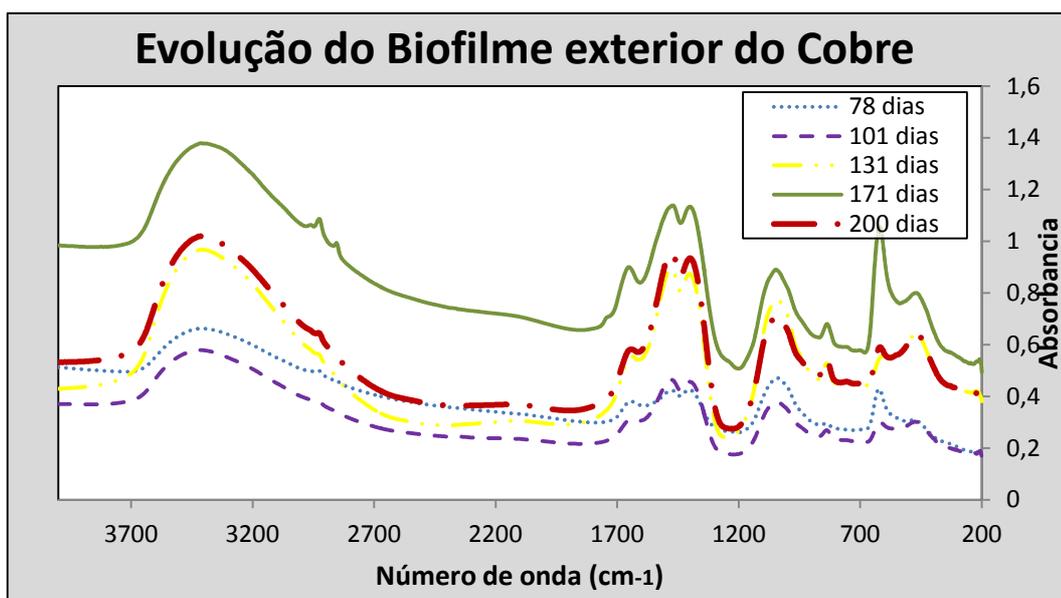


Figura 13. Espectros do biofilme no exterior dos tubos de cobre após cada análise.

Após três meses da implantação do dispositivo, notou-se o desprendimento do biofilme formado na parte externa dos tubos e seu acúmulo do fundo do reservatório. Os espectros desse material antes e depois da calcinação estão apresentados na figura abaixo (figura 14). Comparando os picos apresentados nesses espectros com os picos característicos do biofilme podemos confirmar a presença do mesmo.

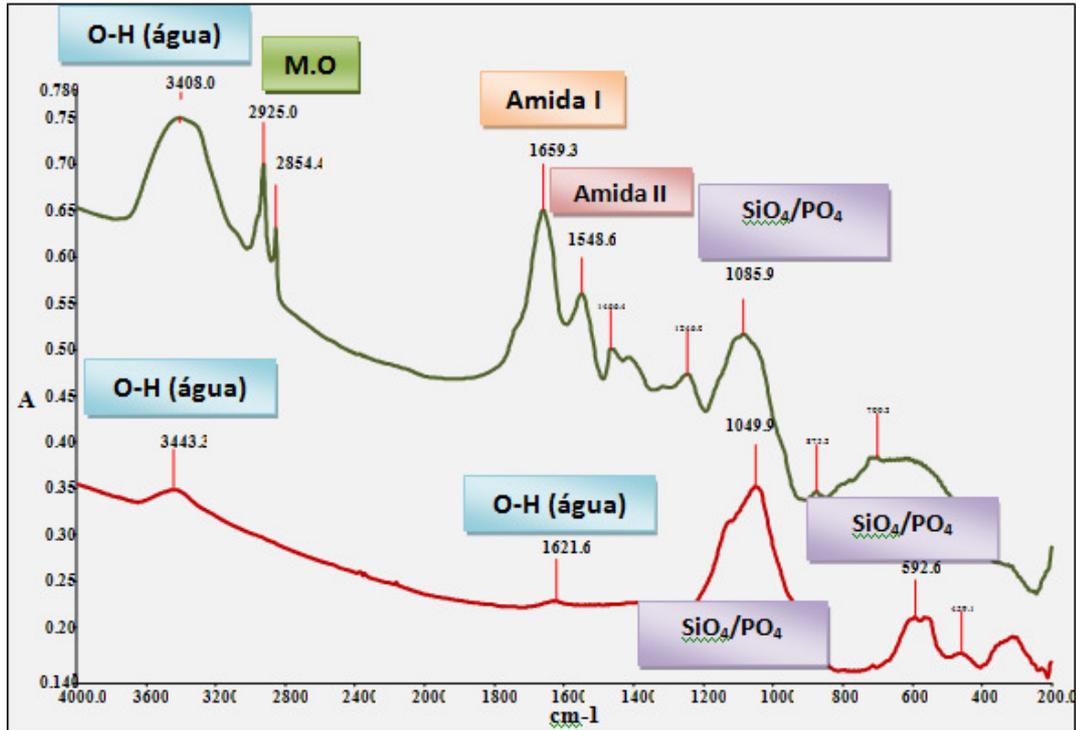


Figura 14. Espectro do biofilme depositado no fundo do reservatório antes e depois da calcinação.

As figuras 15, 16 apresentam os resultados obtidos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do material encontrado no fundo do reservatório após sua calcinação. Esse procedimento permite a identificação dos componentes químicos da amostra e assim diferenciar os alumino silicatos dos fosfatos, que apresentam o mesmo pico na análise de infravermelho.

Tal análise permite concluir que na amostra tem-se a presença tanto de alumino silicatos quanto de fosfatos, sendo estes últimos provenientes do tratamento da água do rio Sena com fosfatos.

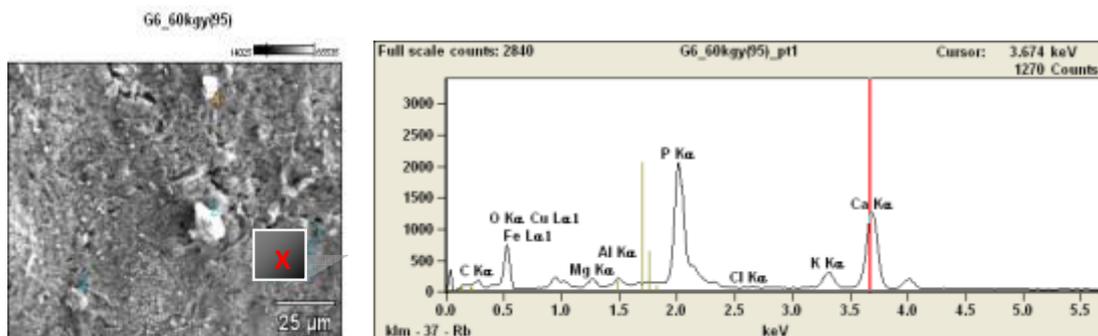


Figura 15. Componentes minerais do biofilme encontrado no fundo do reservatório.

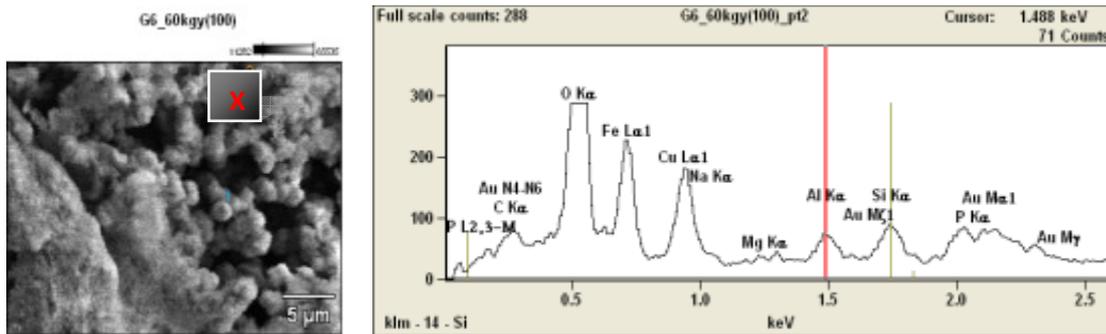


Figura 16. Composição química do biofilme encontrado no fundo do reservatório.

A mesma análise foi feita nos produtos de corrosão encontrados no cobre com objetivo de confirmar tal suposição. A figura 17 apresenta os resultados que comprova que o material encontrado nas paredes dos tubos de cobre é realmente proveniente da oxidação.

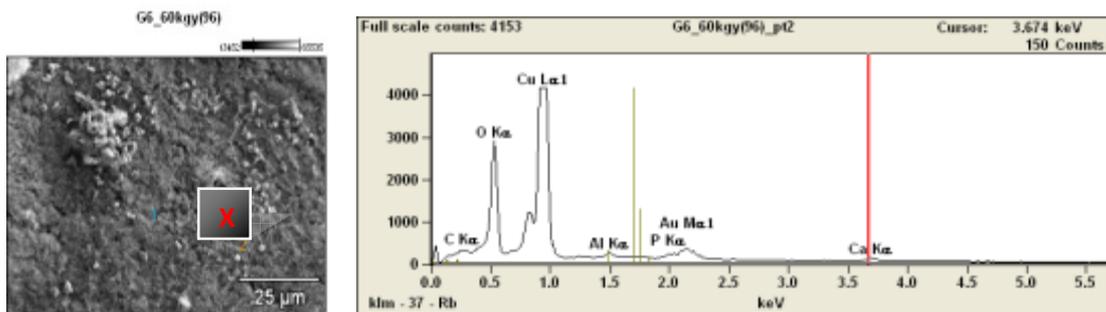


Figura 17. Produtos de oxidação do cobre.

Além do biofilme depositado no fundo do reservatório, observou-se também a presença de um tártaro branco. Foi feita uma análise no infravermelho com objetivo de caracterizar esse material e o espectro obtido está representado abaixo (figura 18). De acordo com seus picos característicos, pode-se concluir que o depósito corresponde à calcita. Tal fato pode ser explicado devido à diferença de TAC da água acumulada no reservatório após cinco meses do início das análises com relação ao seu valor inicial. Para conhecimento o valor de TAC da água do reservatório após cinco meses foi de 22 F, ou seja, 3,5 F a mais que o valor encontrado na alimentação.

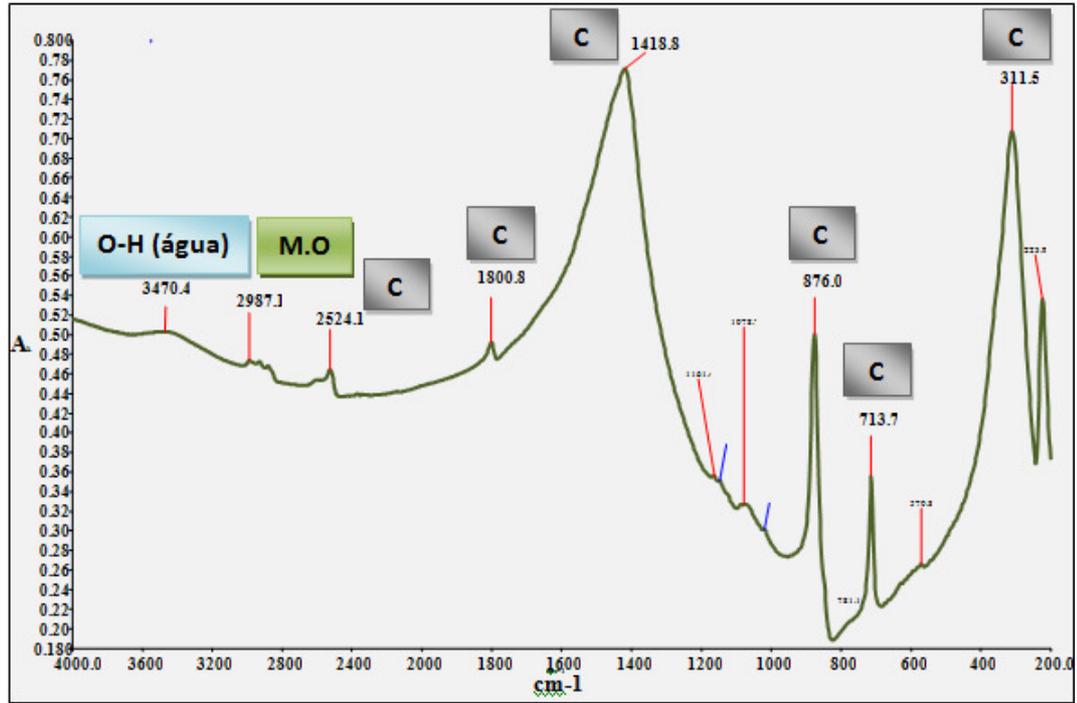


Figura 18. Espectro do tártaro encontrado no fundo do reservatório.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo da cinética de formação do biofilme e de seus componentes minerais nos permite inicialmente concluir que estes apresentam sempre componentes minerais, mais especificamente alumínio silicatos e/ou fosfatos.

Outra observação que pode ser feita é a maior rapidez de formação no interior dos tubos, onde há uma circulação em vazão constante da água, que pode ser explicado pelo fato de que durante a circulação os materiais nutritivos são renovados e permitem a fixação e evolução mais rápida das colônias.

Como esperado os materiais mais nutritivos (borracha e polietileno) favorecem a formação direta do biofilme nas paredes de seus tubos, possuindo também uma influência indireta sobre os outros materiais não nutritivos. Logo, materiais “inertes”, não corrosivos, podem ser facilmente colonizados desde que haja um fornecimento contínuo de nutrientes.

Em materiais corrosivos, como o cobre, não se observou em nenhum momento a formação de biofilmes, porém estes apresentam produtos de corrosão que podem ser tão ou mais nocivos que a formação das colônias.

Um fato não observado em outros estudos foi a o desprendimento dos biofilmes do exterior dos tubos ao longo do tempo e seu depósito no fundo do reservatório, que apresenta também traços de um tártaro branco identificado posteriormente como sendo calcita.

Recomenda-se um estudo em paralelo da parte microbiológica dos produtos encontrados, pois de acordo com a colonização é possível se analisar o grau de nocividade do biofilme para a saúde humana assim como para a qualidade dos materiais na presença dos mesmos.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] ANGELL P. **Understanding microbially influenced corrosion as biofilm mediated changes in surface chemistry.** 1999, Current Opinion in Biotechnology, pp 10:269-272.
- [2] APILFINEZ I., GUTIDRREZ A., DÍAZ M. **Effect of surface materials on initial biofilm development.** 1998, Bioresource Technology 66 (199S), pp 225-230.
- [3] ALLION A., LASSIAZ S., PEGUET L., BOILLOT P., JACQUES S., PEULTIER J., BONNET M-C. **Durabilité des aciers inoxydables et développement de biofilms dans les réseaux d'eau potable : étude comparative avec d'autres matériaux couramment utilisés,** 2010. Water quality journal. DOI : 10.1051/water/2010002.
- [4] AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. **The Role of Exopolymers Produced by *Sphingomonas paucimobilis* in Biofilm Formation and Composition,** 2000. Biofouling, **16** (1), 17-27.
- [5] AZEREDO, J.; OLIVEIRA R. **The Role of Exopolymers in the Attachment of *Sphingomonas paucimobilis*,** 2000. Biofouling, **16**, 59-67.
- [6] BAKKE, R.; TRULEAR, M. G.; ROBINSON, J. A. AND CHARACKLIS, W. G. **Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Steady State,** 1984. Biotech. and Bioeng., **26**, 1418-1424.
- [7] BESNER, M. C., **Influence des paramètres structurels et opérationnels sur la qualité de l'eau dans un réseau de distribution,** 1999. Tese (Doutorado) - l'Université de Montréal, Canadá.
- [8] BOARI, C. A.. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo,** 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- [9] BOILLOT P. JACQUES S., PEULTIER J., ALLION A., LASSIAZ S., PEGUET L., BONNET M-C.. **2-year exposure of stainless steels and other commonly used materials in a pilot simulating a natural drinking water network : a biofilm development study,** 2010. CeoCor Conference – Brugge Belgica.
- [10] BOTT, T. R. **Fouling of Heat Exchangers,** 1995. Amsterdam: Elsevier.

- [11] BOURION, F. **Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono - et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua***, 1995. Tese (Doutorado) - l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, França.
- [12] BOUTALEB N. **Étude de la formation de biofilms sur les surfaces des matériaux couramment utilisés dans les canalisations de l'eau potable**, 2007, Tese (Doutorado em Química) - l'Université de Bretagne-Sud, França.
- [13] CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**, 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- [14] CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**, 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- [16] CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. MCCORMICK, ET M. A. GHANNOUM. **Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance**, 2001. J Bacteriol. 183:5385-5394.
- [17] CHARACKLIS, W. G. **Biofilms. Edited by W. G. Characklis & K. C. Marshall**, 1989. New York: Wiley. 55-89.
- [18] CHARACKLIS, W. G. **Laboratory Biofilm Reactors**, 1990. In: Characklis, W. G.; Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 55-89.
- [19] CHAVES, L. C. D.. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**, 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- [20] CHRISTENSEN, B. E., CHARACKLIS, W. G. **Physical and Chemical Properties of Biofilms**, 1990, In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130.
- [21] COSTERNON, J. W.; IRVING, R. T. AND CHEN, K. J. **The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease**, 1981. Annu Rev. Microbiol., **35**, 299-304.
- [22] FLEMMING, H-C; GEESSEY, G. G. EDS. **Biofouling and Biocorrosion in industrial Water Systems**, 1991. Heidelberg, Springer- Verlag, 47-80.

- [23] FLEMMING, H-C. **Biofilms and Environmental Protection**, 1993. Water Science and Technology, 27 (7-8), 1-10.
- [24] HOTCHET B., REBOUTÉ G., LÉDION J. **Étude de la composante minérale de biofilms**, 2008. PJE : PAF08118.
- [25] LAHAYE, E. **Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien**, 2006. Tese (Doutorado Química) - l'Université de Bretagne-Sud, França.
- [26] LETHOLA, M. J., I. T. MIETTINEN, , M. M. KEINÄNEN, T. KEKKI, , O. LAINE, A. HIRVONEN, T. VARTAINEN, P. MARTIKAINEN. **Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes**, 2004. Water Res. 38:3769–3779.
- [27] LETHOLA, M. J., I.T. MIETTINEN, T. LAMPOLA, A. HIRVONEN, T. VARTAINEN, P.J. MARTIKAINEN. **Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems**, 2005. Water Res. 39:1962–1971.
- [28] LITTLE, B. J., P. WAGNER, J. S. MAKI, M. WALCH, R. MITCHELL. **Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces**, 1986. The Journal of adhesion. 20:187-210.
- [29] MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**, 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- [30] MARSHALL, K. C., R. STOUT, R. MITCHELL. **Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces**, 1971. T. Gen. Microbiol., 68:337-348.
- [31] MAUL, A., A. H. EL-SHAARAWI, ET J. C. BLOCK. **Heterotrophic bacteria in water distribution systems. I. Spatial and temporal variation**, 1985. Sci. Total Environ. 44:01 - 214.
- [32] NEU, T. R. **Ecophysiology and Structure – Biofilms and Microbial Mats**, 1994. *In*: Krumbein, W. E.; Paterson, D. M. e Stal, L. J. eds. Biostabilization of Sediments. Oldenburg, Germany: Verlag, 9-15.

[33] PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**, 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

[34] RIZET, M., J. BLANC, M. COGNET, M. DERONS, N. DORIZON, AND G. FILIPPI. **Qualité de l'eau dans les reseaux de distribution, son evolution biologique et chimique**, 1984. J. Fr. Hydrol. 15:207- 221.

[35] SADIKI, A. I., D. T. WILLIAMS, R. CARRIER, B. THOMAS. **Pilot study on the contamination of drinking water by organotin compounds from PVC materials**, 1996. Chemosphere. 32:2389-2398.

[36] STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**, 5th Edition, 1995. MacMillan Press, London, 207-209.

[37] STANLEY, P. M. **Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel**, 1983. Can. Journal of microbiology. 29:1493-1499.

[38] VAN DER KOOIJ D., VEENENDAAL H., BAARS-LORIST C., VAN DER KLIFT D., DROST Y.. **Biofilm formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water**, 1995. Wat. Res, Vol. 29, No. 7, pp. 1655-1662.

[39] VAN DER WENDE, E.; CHARACKLIS, W. G. **Biofilms in Potable Water Distribution Systems**, 1990. In: Drinking Water Microbiology, Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N.Y. Inc.; 250-268.

## ANEXOS

As figuras a seguir apresentam as relações entre os três principais componentes do biofilme - matéria orgânica (M.O), banda Amida I e alumínio silicato e/ou fosfato – e a água para os demais materiais estudados durante o projeto. Vale salientar que os gráficos para a borracha e o titânio já estão representados no corpo deste projeto.

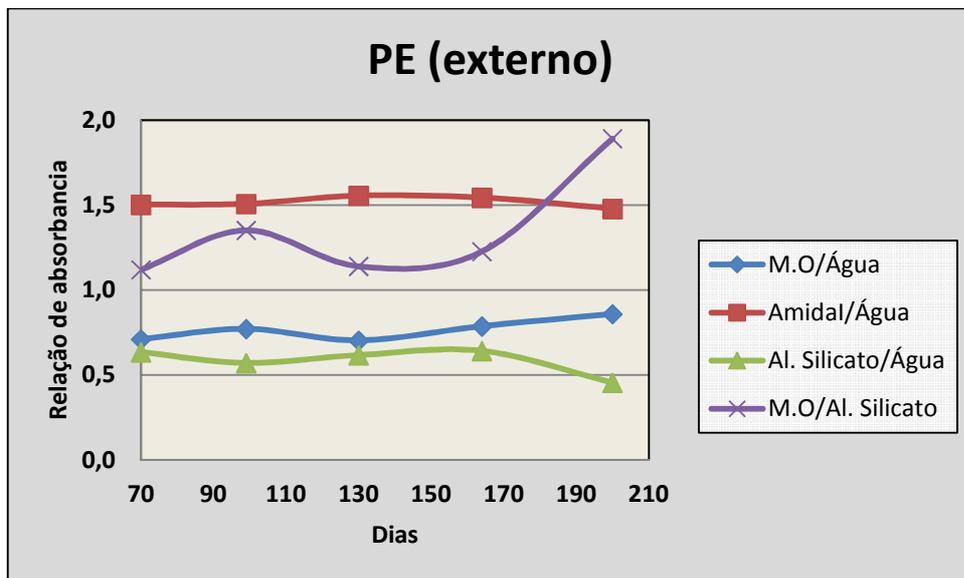


Figura 19. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de polietileno.

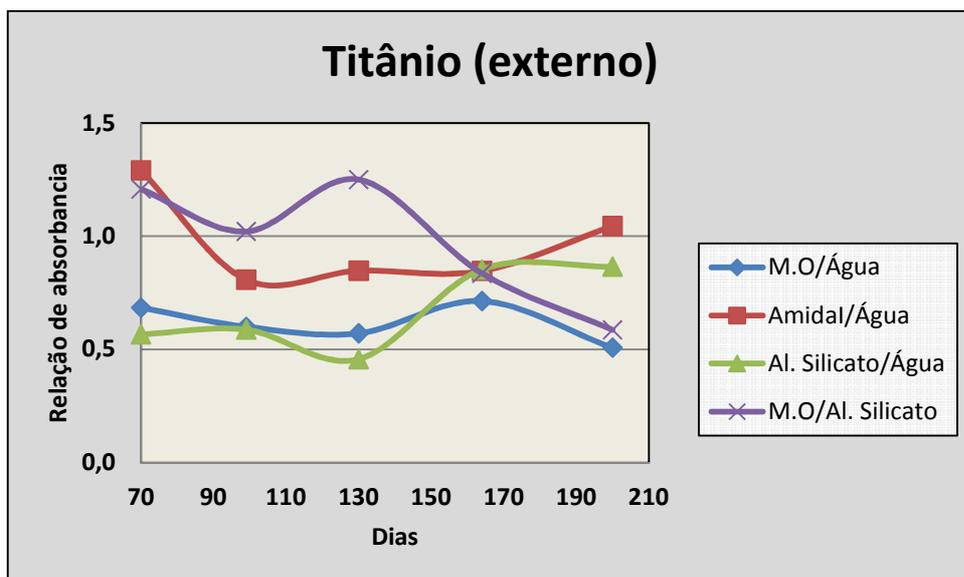


Figura 20. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de titânio.

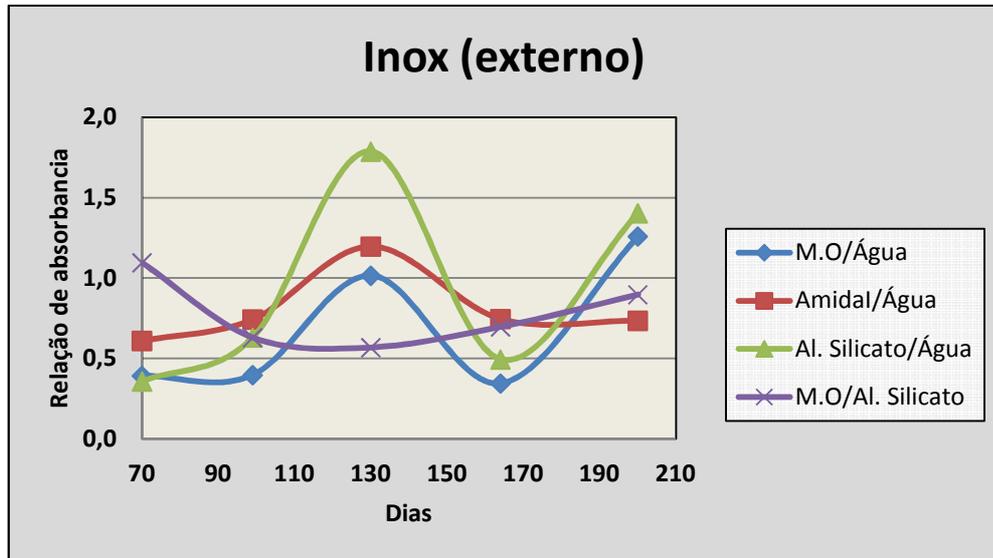


Figura 21. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de aço inoxidável.

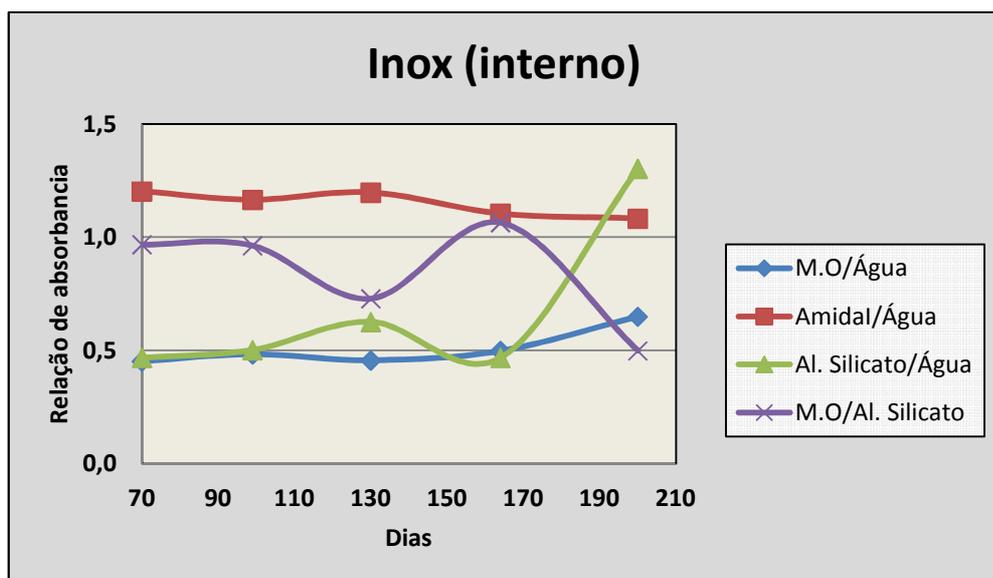


Figura 22. Evolução do biofilme no interior dos tubos de aço inoxidável.

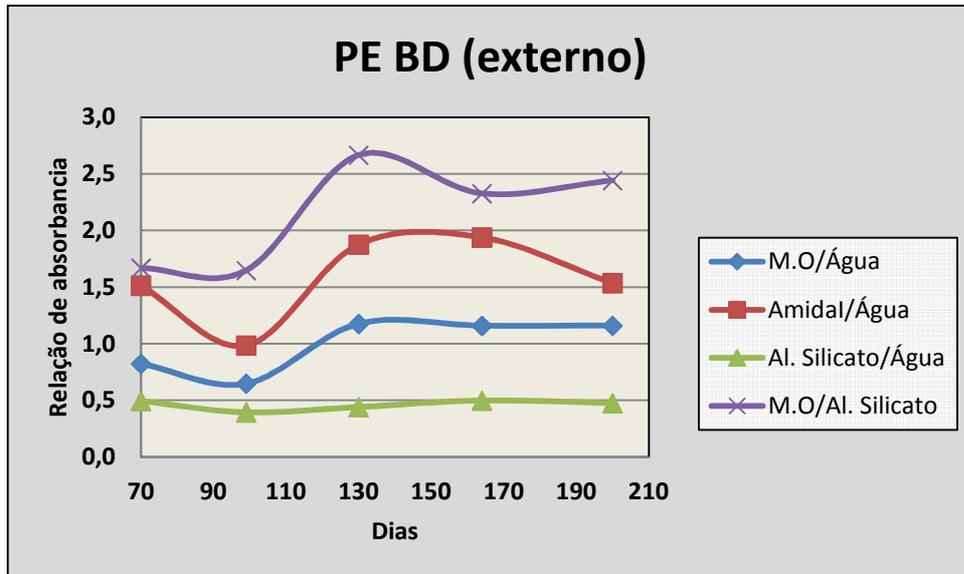


Figura 23. Evolução do biofilme no exterior dos tubos de polietileno de baixa densidade.

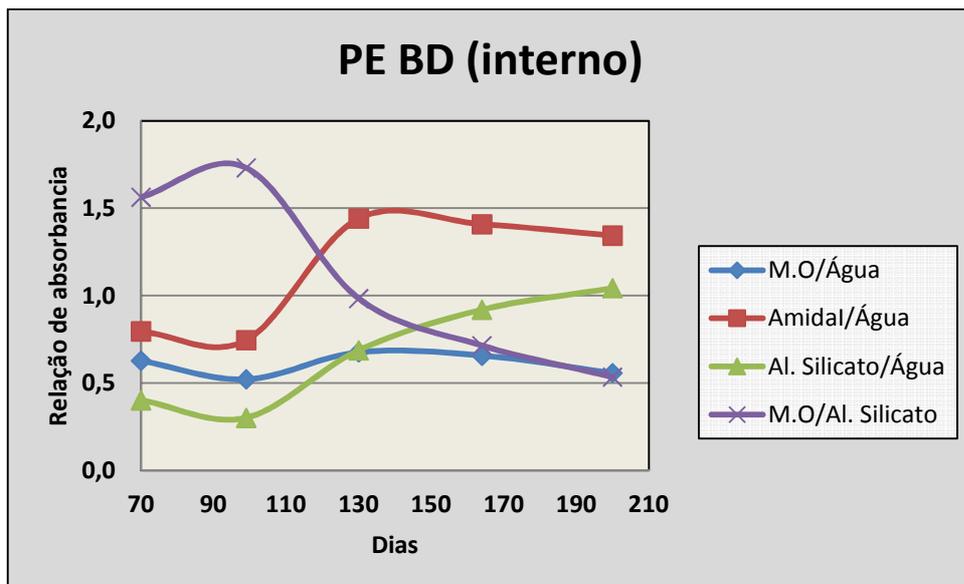


Figura 24. Evolução do biofilme no interior dos tubos de polietileno de baixa densidade.