



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ANTICORROSIVOS DE NOVA
GERAÇÃO CONTRA BACTÉRIAS MARINHAS**

CLÁUDIA DE LIMA RAMOS AQUAROLI

SÃO VICENTE – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ANTICORROSIVOS DE NOVA
GERAÇÃO CONTRA BACTÉRIAS MARINHAS**

Cláudia de Lima Ramos Aquaroli

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para
obtenção do título de grau de Bacharel em
Ciências Biológicas com habilitação em
Gerenciamento Costeiro.

SÃO VICENTE - SP

2023

A656t Aquaroli, Cláudia
TOXICIDADE DE COMPOSTOS ANTICORROSIVOS DE
NOVA GERAÇÃO CONTRA BACTÉRIAS MARINHAS / Cláudia
Aquaroli. -- São Vicente, 2023
23 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Ottoni

1. Anticorrosivos. 2. LDH. 3. MBT. 4. Atividade antimicrobiana. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida nesta encarnação e pelos seres de luz no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, avós, e família, por todo apoio, incentivo e amor. Devo tudo a vocês.

Agradeço à minha orientadora, por toda paciência, incentivo, amor e, principalmente, por não me deixar desistir naquela época.

Agradeço aos colegas de laboratório por toda ajuda, principalmente a Marjorie por me escutar quando precisei.

Agradeço aos colegas de outros laboratórios também, ao Caio, a Mariana e Juliana do laboratório do Prof. Denis. A Roberta, Augusto e Maysha do laboratório da Prof. Ana Julia.

Agradeço aos meus amigos, pela companhia em momentos de descontração e alegrias, jamais esquecerei de vocês. Grupinho bom, ver vocês se tornando mulheres cada dia mais independentes me enche de orgulho. E minha inspiração, abelhinhas da família Colméia, obrigada por me escolherem e acolherem. Amo vocês.

Agradeço ao PIBIC e ao Programa de bolsas da UNESP, pelo incentivo financeiro.

" Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever "

Mahatma Gandhi

RESUMO

Dentro do contexto da exploração e utilização do ambiente marinho nos mais diversos âmbitos, tem-se em contraponto os problemas e atrasos causados pela corrosão dos materiais. Visto isso, surge a necessidade de investigar os efeitos de anticorrosivos de nova geração contra microrganismos que possam promover o processo de corrosão. Neste estudo foram utilizados anticorrosivos orgânicos e inorgânicos de nova geração, encapsulados em hidróxido duplo lamelar (LDH) e seus precursores contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio aestuarius* nas concentrações de 0 - 100 mg/L por meio da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB). Nenhum dos compostos utilizados apresentaram atividade bactericida. O composto ZnAl LDH MBT promoveu efeito bacteriostático em concentrações $\geq 33,3$ mg/L contra as bactérias *V. parahaemolyticus* e *B. cereus* após 24 horas de exposição. O nanoencapsulamento do biocida MBT utilizando o LDH, promoveu maior eficiência contra a potencial formação de biofilme de duas bactérias marinhas, porém, são necessários outros estudos complementares para investigar o mecanismo sob o ponto de vista de um ambiente dinâmico e com exposição crônica.

Palavras-chave: *Anticorrosivos, LDH, MBT, Atividade antimicrobiana.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM - Corrosão Influenciada por Microrganismos

CI50 - Concentração Inibitória em 50% ()

CMB - Concentração Mínima Bactericida

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CO - Corrosão

DCOIT - 4.5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona

DO - Densidade óptica

LDH - Hidróxido Duplo Lamelar

MBT - 2-mercaptobenzotiazol

MgAl LDH - MgAl Nanoestruturado

MgAl MBT LDH - MgAl Mercaptobenzotiazol Nanoestruturado

NO² - Nitrito

PIBIC - Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica

SG - Gluconato de Sódio

TSA - Triptona de Soja e Ágar

TSB - Triptona de Soja

UFC/mL - Unidades Formadora de Colônia por Mililitros

ZnAl LDH - ZnAl Nanoestruturado

ZnAl MBT LDH - ZnAl-Mercaptobenzotiazol Nanoestruturado

ZnAl LDH NO² - Nitrito Nanoestruturado

ZnAl-LDH-SG - ZnAl-Gluconato de Sódio Nanoestruturado

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Biocorrosão	9
2.2. Bactérias	10
2.3. Biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT)	10
2.4. Hidróxido duplo lamelar (LDH)	11
3. OBJETIVO	12
4. METODOLOGIA	12
4.1. Microrganismos	12
4.2. Compostos	12
4.3. Crescimento bacteriano	12
4.4. Ensaios antimicrobianos	13
4.5. Análises estatísticas	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1. Curva de crescimento bacteriano	13
6. CONCLUSÃO	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

A corrosão (CO) é uma manifestação espontânea que deteriora materiais metálicos. O processo ocorre por meio de reações eletroquímicas de oxidação e redução [1]. A interação química e/ou física entre o objeto e o agente corrosivo reduz a durabilidade, causa desgastes e pode até provocar mudanças estruturais nos equipamentos, tornando-os ineficazes para os fins que foram designados. Sendo assim, a CO é um obstáculo enfrentado por diversos segmentos industriais do mundo [2]. Em acréscimo, é importante ressaltar que este estudo contempla os objetivos de desenvolvimento sustentável 12 e 14, proposto pela Organização das Nações Unidas e que integram a Agenda 2030.

O fenômeno da CO no ambiente marinho possui padrões diversificados e complexos. Os principais mecanismos que envolvem a CO e a bioincrustação marinha estão associados à influência microbiológica. Diferentes microrganismos são conhecidos por catalisar as reações de CO, incluindo bactérias, arqueas, fungos, líquens e algas [3,4]. A formação do biofilme é um processo fundamental para a manutenção de muitas formas de vida, uma vez que, proporciona resistência a fatores externos como temperatura, pH e até substâncias biocidas [5,6].

Devido à crescente exploração do ambiente marinho, o impacto econômico desencadeado pela CO tem se tornado cada vez mais evidente. A degradação dos metais provoca falha nos equipamentos, atraso de diversas atividades cotidianas, danifica infraestruturas e pode até causar acidentes [7,8]. De acordo com a Associação para Proteção e Desempenho de Materiais, organização que atende cerca de 35.000 membros distribuídos em mais de 135 países, no ano de 2016 os prejuízos causados pela CO foram em torno de US\$ 2,5 trilhões de dólares, sendo que cerca de 20% desse valor foi destinado a reparos associados a CO influenciada por microrganismos (CIM) [9]. A CIM é induzida pelos efeitos sinérgicos de várias espécies microbianas que coexistem no biofilme e no meio ambiente. A partir desta variedade de microrganismos, suas diferentes características metabólicas têm sido isoladas e identificadas [10].

Quando se trata da biodeterioração metálica, as bactérias são consideradas os principais microrganismos envolvidos no processo, devido à rápida assimilação dos nutrientes presentes no ambiente [11]. Existem diversos estudos que associam a indução da CIM com bactérias aeróbicas e anaeróbicas, entretanto, é muito raro encontrar culturas puras nos ambientes naturais. Na natureza a cultura bacteriana também está na forma de biofilme. O biofilme é construído por complexas e dinâmicas comunidades associadas à superfície [12]. Além da aceleração no processo de CO, os microrganismos também podem induzir a inibição da CO por diversos padrões, como consumo de substâncias corrosivas, formação de camadas protetoras constituída por substâncias poliméricas extracelulares e produção de camadas mineralizadas [13].

No estudo de Wan *et al.* [14] utilizando a bactéria *Bacillus cereus*, foi avaliada a capacidade do microrganismo de promover o mecanismo corrosivo através da redução

do nitrato presente nos encanamentos de aço. Guo *et al.* [15] reportaram que a bactéria *Vibrio natriegens* sofreu inibição no processo de CO na presença de *Bacillus subtilis*. De acordo com os autores, *B. subtilis* forneceu proteção anticorrosiva para a superfície metálica na presença das bactérias *V. natriegens*, indutoras de corrosão. Para ligas de alumínio, *B. subtilis* também apresentou um papel protetor contra a CO através de um filme biomineralizado de forma híbrida, demonstrado por Shen *et al* [16]. Já Wu et al. [17], identificaram graus menores de CO em aço carbono Q234 na presença de *Pseudoalteromonas sp.*

Os microrganismos fazem respiração convertendo moléculas importantes em energia para as células, e seus receptores de elétrons nesse processo podem ser oxigênio, nitrato, sulfato ou carbonato. O oxigênio dissolvido presente no ambiente aquático funciona como despolarizador, causando CO. Então, considerando um biofilme composto por microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, o consumo de oxigênio próximo a superfície do metal cria uma zona com baixa ou nenhuma oxigenação, impedindo a reação da CO. Entretanto, a realidade ambiental é multifatorial e não homogênea, e essas variações podem acabar promovendo a CO ao invés de inibi-la [18].

A forma mais popular para combater a CIM é por meio da utilização de compostos inibidores (CI), um grupo de substâncias que podem ser empregadas para proteger a superfície do metal contra a CO. Apesar do baixo custo e da eficiência, os CI à base de cromato estão sendo proibidos em diversos países devido a sua natureza tóxica, implicando numa necessidade crescente em desenvolver sistemas utilizando materiais mais ecológicos [19].

Um dos compostos que se sobressai devido à demanda emergente de proteção contra CO é o Hidróxido duplo lamelar (LDH), também referenciado como argila aniônica ou hidrotalcita. Sua aplicação vem se expandindo como resultado de sua estrutura bidimensional única e suas propriedades de troca aniônica [20]. Podem ser constituídos a partir da combinação de uma ampla gama de cátions metálicos, como Zn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Cr^{+3} , Co^{+3} , Fe^{+3} , V^{+3} , Y^{+3} , Mn^{+3} , Ga^{+3} , dentre outros [21]. Estes componentes funcionam como micro/nanocontêineres, recipientes utilizados para a incorporação de inibidores contra CO. O LDH pode proteger em sua estrutura os inibidores orgânicos sensíveis à luz do processo de fotodegradação. Cao et al. [22] destacam que o processo de fotodegradação do biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT), foi significativamente evitado ao encapsular o MBT em nanocontêineres de LDH. O modo operacional das nanoestruturas de LDH envolve (a) liberação de ânions inibidores enquanto (b) captura de espécies corrosivas como Cl^- e/ou (c) formação catódica de um filme de hidróxido.

Diante do exposto, o presente trabalho avaliou os compostos 2-mercaptobenzotiazol (MBT), ZnAl-mercaptobenzotiazol nanoestruturado (ZnAl MBT LDH), MgAl mercaptobenzotiazol nanoestruturado (MgAl MBT LDH), ZnAl nanoestruturado (ZnAl LDH), MgAl nanoestruturado (MgAl LDH), Gluconato de Sódio (SG), ZnAl-gluconato de sódio nanoestruturado (ZnAl-LDH-SG), Nitrito (NO^2), nitrito

nanoestruturado (ZnAl LDH NO²) quanto a capacidade de inibição de crescimento de quatro bactérias marinhas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biocorrosão

A CIM, ou biocorrosão, trata-se das atividades microbianas danosas que ocorrem anexadas à superfícies de materiais. Dentre todas as falhas estruturais causadas pela CO, a CIM corresponde a cerca de 20% dessa deterioração [14, 23]. A formação de biofilme sobre as superfícies metálicas pode induzir e acelerar o processo, que é desencadeado pela condição biológica dos microrganismos ali presentes [24]. As bactérias desenvolvem um papel predominante na CIM em virtude de suas características, como o pequeno tamanho que reflete numa alta superfície de contato, isso faz com que elas consigam mediar reações químicas de uma maneira mais rápida do que organismos maiores, por exemplo. A própria atividade metabólica bacteriana de consumir matéria orgânica para produzir biomassa já é capaz de alterar de maneira local aquele ambiente, ocasionando CO do material [25].

De acordo com Noyel *et al.* [25], os grupos bacterianos majoritariamente associados à CIM são as bactérias redutoras de sulfato (BRS), oxidantes de ferro (BOF), produtoras de ácidos e formadoras de biofilme viscoso. Num ambiente anaeróbico são determinantes BRS dos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* logo nas camadas mais próximas do metal onde o nível de oxigênio é baixo, estando associadas a qualquer fonte de enxofre. As BRF podem ser *Siderocapsa*, *Gallionella*, *Sphaerotilus*, e *Hyphomicrobium*, capazes de formar hidróxidos de ferro. Já outras bactérias como *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* e *Bacillaceae* formam agregados e biofilmes que aumentam a CO por conta da produção de substâncias poliméricas extracelulares, como ácidos [14].

A questão da biocorrosão ainda é muito argumentada entre pesquisadores, principalmente a via como cada microrganismo promove as reações químicas. Isso tudo é um processo muito complexo que precisa levar em consideração muitas variáveis, como as alterações do meio ambiente em pH e salinidade, o tipo de metal e suas particularidades, bem como a natureza metabólica do organismo envolvido. O comportamento eletroquímico na interface entre o metal e o agente corrosivo muda na presença dos microrganismos, o que acaba por transformar a reação original [23]. Além disso, também se discute o fato da presença de alguns seres no biofilme que acabam por inibir a CO provocada por outros [26, 27].

2.2. Bactérias

As cepas do gênero *Bacillus* são gram-positivas e aeróbicas, possuem forma de bastonetes (bacilos) e formam esporos. Tanto *B. cereus* quanto *B. pumillus* possuem algum nível de resistência à mudanças de temperatura, pH, salinidade e até alguns níveis de radiação. *B. cereus* pode ser encontrada em diversos ambientes, seja no solo, água ou alimentos, e apresenta importância médica, já que em casos de ingestão pode causar intoxicação alimentar, devido a produção de certas toxinas para o corpo humano. Já *B. pumilus* é valorizada na agricultura como agente de controle de fitopatógenos vegetais, e inclusive, também é capaz de resistir até ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [28]. No estudo de Sharma *et al.* [29], ambas espécies demonstraram grande potencial biorremediador para remoção de chumbo (Pb II) e níquel (Ni II) de amostras de água, em taxas aproximadas de 97% e 84%, respectivamente. Tratando-se da MIC, *B. pumilus* e *B. cereus* podem participar como catalisadores das reações corrosivas [14, 30].

As bactérias do gênero *Vibrio* são Gram-negativas, aeróbicas, em forma de bastonetes curvos e com um flagelo, tanto *V. parahaemolyticus* quanto *V. aestuarinus* estão presentes em água salina e salobra, são de importância médica por parasitarem mexilhões e outros frutos do mar, quando ingeridas causam gastroenterite. *V. parahaemolyticus* possui ocorrência mais sazonal, em estações mais quentes, sendo isolado da zona costeira temperada e tropical no mundo todo [31]. Gao et al. [32] demonstrou que todas *Vibrio spp.* utilizadas no trabalho agiram de modo a inibir a CO num ambiente marinho simulado, associando a presença do biofilme com a diminuição das taxas corrosivas, ou seja, ao produzir essa barreira, às bactérias impediram a entrada dos íons de cloreto e consumiram o oxigênio. Em contraponto, Cheng et al. [24] identificou que a presença de *V. natriegens* acelera a corrosão de aço inoxidável.

2.3. Biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT)

O biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT) (Figura 1) [33] é um composto que tem sido amplamente investigado devido a sua capacidade em formar complexos hidrofóbicos com muitos metais, como ferro, cobre, cobalto, níquel, dentre outros e, devido a esta característica, é referenciado como um excelente inibidor de corrosão [34].

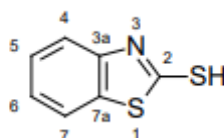


Figura 1. 2-mercaptobenzotiazol (MBT) [33].

A ação do MBT em bactérias afeta as estruturas celulares externas, comprometendo a integridade da membrana bacteriana e a transferência de elétrons envolvidos nas cadeias respiratórias da membrana, sem a absoluta necessidade de penetração na célula [35]. Franchini et al. [36] avaliaram as propriedades

antimicrobianas do MBT e seus derivados. De acordo com os autores, dois derivados apresentaram os melhores resultados contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, cujos valores de concentração mínima inibitória (CIM) foram de 3.12 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente.

Maia et al. [37] realizaram ensaios biológicos utilizando os biocidas MBT e 4.5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (DCOIT) encapsulados em nanocápsulas de sílica. Segundo os autores, as nanocápsulas de sílica vazias não apresentaram efeito sobre a viabilidade celular da linhagem recombinante bioluminescente de *E. coli*. Contudo, MBT@SiNC e DCOIT@SiNC reduziram a atividade metabólica do microrganismo. Os autores destacaram que a redução da bioluminescência foi diretamente correlacionada com o nível de biocida (MBT ou DCOIT) detectado na solução após 8 dias de imersão. O maior nível de inativação foi observado para os revestimentos com maior concentração de biocida (MBT 5% e DCOIT 5%) correspondendo a uma taxa de 45% e 90%, respectivamente.

2.4. Hidróxido duplo lamelar (LDH)

A estrutura básica do LDH ocorre em camadas, geralmente alternando através de cátions polarizadores e íons polarizáveis, resultando num modelo tridimensional [38]. Essa configuração atua como um nanocontainer, ou seja, reveste uma substância de interesse. Tal revestimento é vantajoso, uma vez que possui uma baixa toxicidade e elevada biocompatibilidade [39]. Os LDHs são muito utilizados no direcionamento de medicamentos a nível celular, como catalisadores e estabilizadores, além de possuírem a capacidade de encapsular anticorrosivos [40].

Também considerado um revestimento inteligente, o LDH estende a vida útil de estruturas, justamente através da incorporação como micro ou nano reservatórios, encapsulando materiais ativos [41]. Sendo assim, sua superfície possui permeabilidade controlada, atuando contra a CO e melhorando as propriedades mecânicas de revestimento [41]. Devido a eficiente troca iônica, é um composto que funciona como uma “armadilha”, capturando íons agressivos aos materiais, como o cloreto [43].

Ao incorporar anticorrosivos ao LDH, os inibidores são dispersos de forma mais lenta, garantindo a proteção do metal através de um revestimento orgânico. Como descrito por Hang *et al.* [44], o processo corrosivo foi reduzido ao utilizar o protetor Ácido (benzotiazol-2-iltio)succínico (BTSA) aliado ao LDH nanoestruturado com alumínio de zinco e alumínio de magnésio (Zn/Mg-Al). Em um outro estudo conduzido por Zhang *et al.* [45], um substrato modificado com o composto de Zn-Al LDH foi capaz de remover o cromo hexagonal (poluente severo), que, por sua vez, promoveu um aumento na abundância das culturas bacterianas ali presentes.

3. OBJETIVO

Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos anticorrosivos de nova geração contra bactérias marinhas Gram-positivas e Gram-negativas.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos

As bactérias Gram-positivas *Bacillus pumilus* (PSBp15), *Bacillus cereus* (PSBc15), e as Gram-negativas *Vibrio aestuarinus* (PSVa15) e *Vibrio parahaemolyticus* (PSVp15) foram isoladas da região estuarina da Baixada Santista, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Marinha (MicroMar) do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

4.2. Compostos

Os compostos utilizados no presente estudo foram o biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT), ZnAl-mercaptobenzotiazol nanoestruturado (ZnAl MBT LDH), MgAl mercaptobenzotiazol nanoestruturado (MgAl MBT LDH), ZnAl nanoestruturado (ZnAl LDH), MgAl nanoestruturado (MgAl LDH), e também os anticorrosivos orgânicos Gluconato de Sódio (SG), ZnAl-gluconato de sódio nanoestruturado (ZnAl-LDH-SG), Nitrito (NO₂), nitrito nanoestruturado (ZnAl LDH NO₂).

4.3. Crescimento bacteriano

Os microrganismos foram preservados em ultrafreezer a -80 °C utilizando microtubos de 2 mL que continham 1,5 mL de meio de cultura Triptona de Soja (TSB) e glicerol 60% ajustado a uma salinidade de 35 g/L. Para reativação bacteriana, foi utilizado um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio TSB e 1 mL do inóculo. O frasco Erlenmeyer foi inserido em plataforma agitadora a 180 rpm, temperatura constante de 37 °C "overnight". Um volume de 1 ml do caldo bacteriano foi inserido em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL meio TSB, mantendo as mesmas condições da etapa anterior. A cada 1 h, foi retirado um volume de 1 ml da amostra para determinação da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm. Cerca de 20 µl do inóculo foi inoculada em placas de Petri que continham caldo Triptona de Soja com Ágar (TSA), para verificação do crescimento em unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

4.4. Ensaios antimicrobianos

Os testes de concentração mínima inibitória (CMI) foram realizados em placas de 96 poços. A concentração celular microbiana inicial foi ajustada a 10^5 UFC/mL. O controle positivo utilizado foi nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de 10 mg/L e o controle negativo apenas caldo TSB. As concentrações dos anticorrosivos foram 0,05; 0,14; 0,41; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 e 100 mg/L. Cada poço foi previamente preenchido com TSB e caldo bacteriano totalizando um volume de 170 μL , posteriormente, foi adicionado foram adicionados 20 μL dos anticorrosivos previamente diluídos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Passado esse período, foi acrescentado aos poços 10 μL do indicador colorimétrico Resazurina 0,025% (caso exista reação com oxigênio a cor ficará rosa, caso contrário a cor ficará azul) para observação visual do resultado. As placas foram mantidas nas mesmas condições por 24h. Para estabelecer a concentração mínima bactericida (CMB), foi retirada uma alíquota de 15 μL de cada poço e transferida a uma placa de Petri com TSA. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica à 37 °C por 24h para identificar as unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5. Análises estatísticas

Após os ensaios antimicrobianos foi definida a CMI e a CMB. Já para análise da concentração inibitória em 50% (CI50) foi utilizado o programa Past4, os dados foram previamente normalizados e depois submetidos ao teste não paramétrico post-hoc de Dunn. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de crescimento bacteriano

Para delinear o crescimento de uma bactéria isolada, as células são inseridas num meio líquido, controlando as condições ambientais e oferecendo todos os nutrientes necessários para o crescimento microbiano. Dessa forma, a quantidade de células se expande, formando a biomassa bacteriana, que pode ser mensurada em função do tempo por meio de uma curva de crescimento. Tal curva permite acompanhar as fases de crescimento microbiano (Figura 2). As fases de crescimento são denominadas de Lag, exponencial, estacionária e de queda (ou morte celular). Cada estágio representa um período de crescimento diferente, de acordo com as mudanças fisiológicas na cultura celular [46].

Crescimento bacteriano

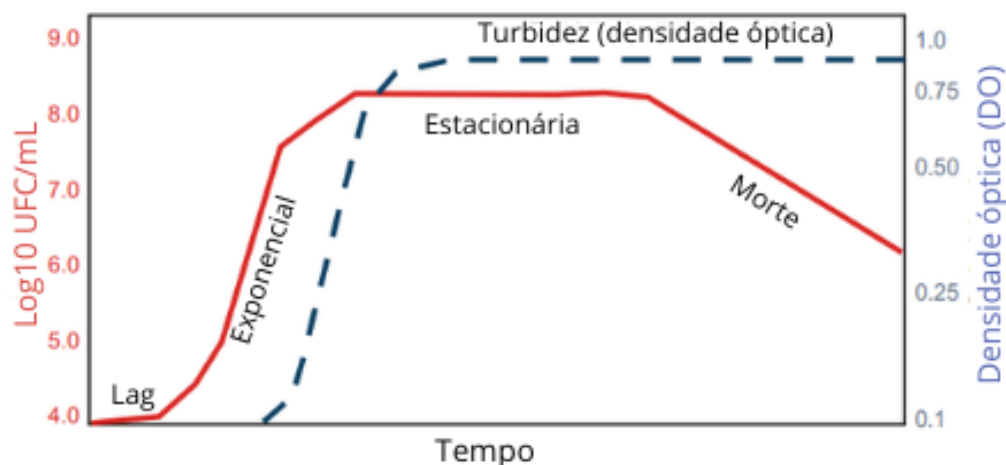


Figura 2. Curva de crescimento bacteriano adaptada de Maier & Pepper [45].

A determinação das curvas de crescimento das linhagens *V. aestuarinus* (Figura 3), *V. parahaemolyticus* (Figura 4), *B. cereus* (Figura 5) e *B. pumilus* (Figura 6), ocorreu por meio da leitura da Densidade óptica (DO) em absorvância 600 nm por um período de 8h. A DO foi correlacionada ao número de colônias determinadas por plaqueamento. Este procedimento é fundamental para a determinação da fase exponencial do crescimento microbiano, para assim, realizar os testes de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) e CI50.

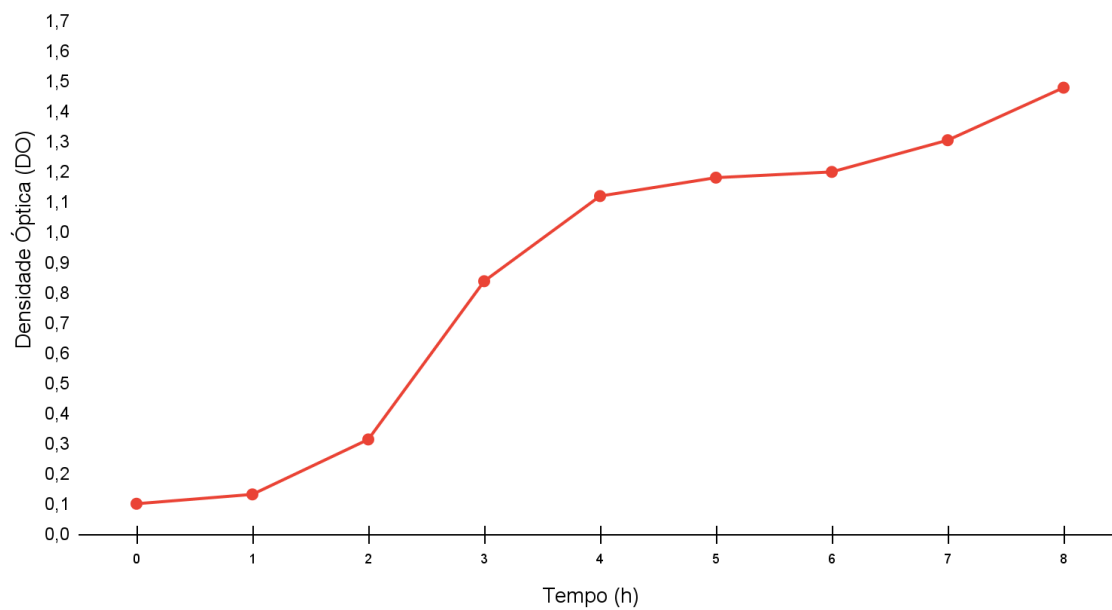


Figura 3. Curva de crescimento em função do tempo de *V. aestuarinus* por DO.

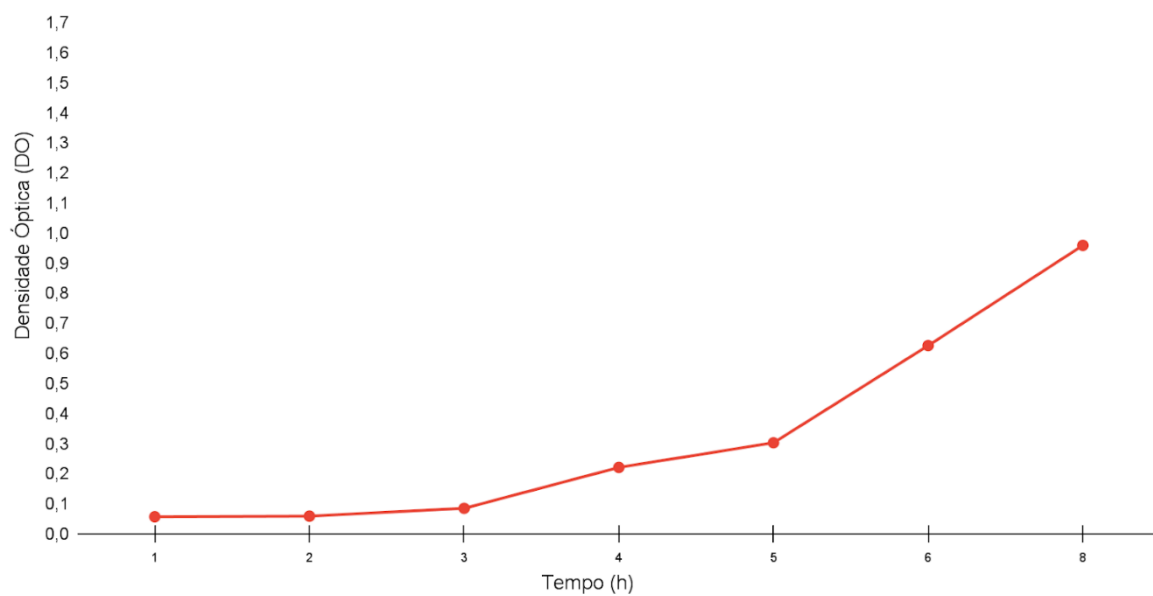


Figura 4. Curva de crescimento em função do tempo de *V. parahaemolyticus* por DO.

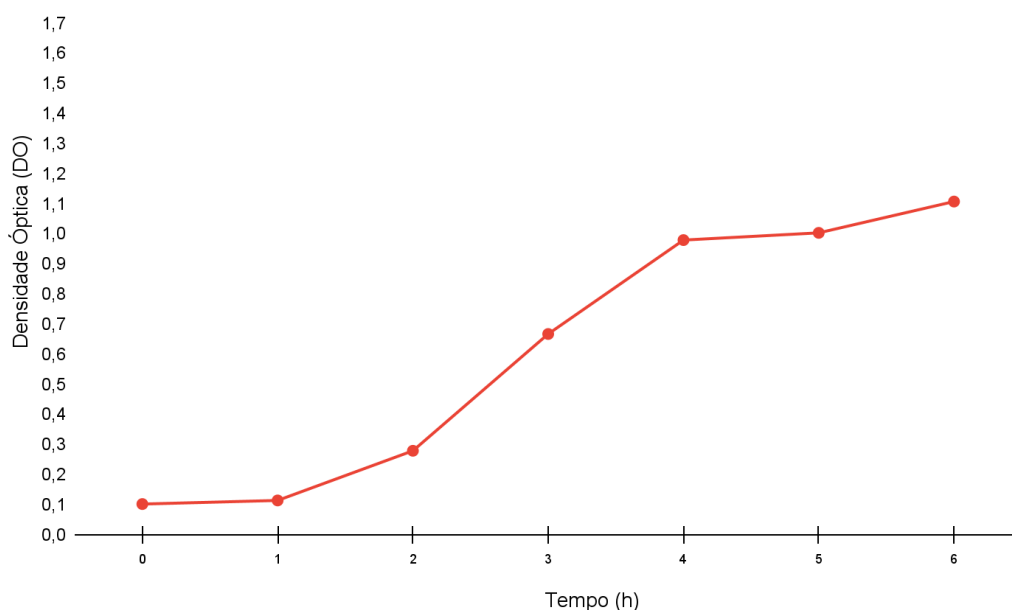


Figura 5. Curva de crescimento em função do tempo de *B. cereus* por DO.

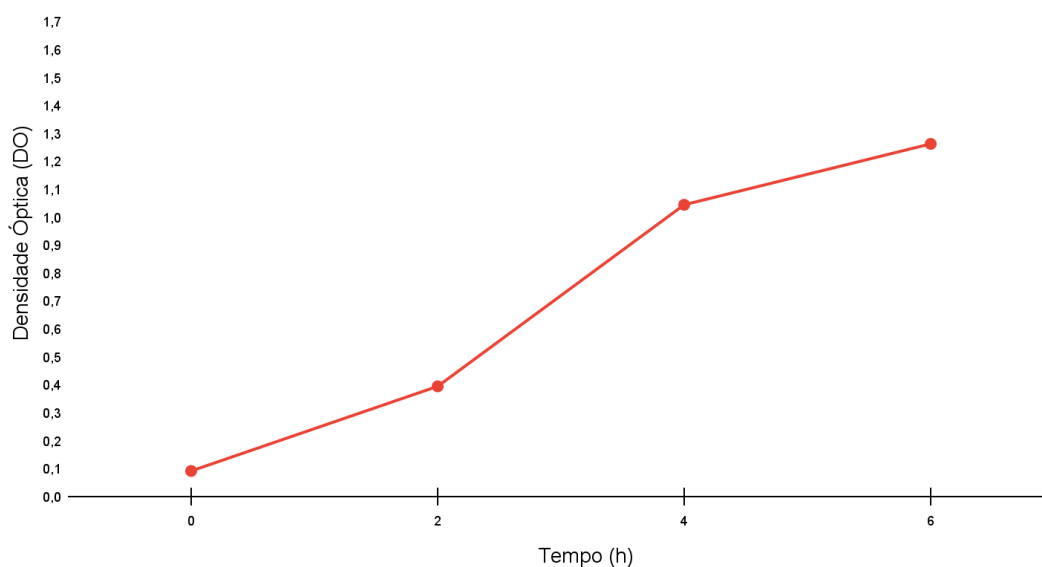


Figura 6. Curva de crescimento em função do tempo de *B. pumilus* por DO.

Após a construção da curva de crescimento de todas as bactérias, foi determinado o momento da fase exponencial, para *V. aestuarinus* foi de 3 h, para *V. parahaemolyticus* foi de 4 h, para *B. cereus* foi de 4 h e para *B. pumilus* foi de 6 h. Após esses resultados, foram realizados os ensaios antimicrobianos.

Os ensaios de CMI e CMB, com os compostos selecionados para o estudo, não apresentaram efeito bactericida (Tabela 1), em 24 h de exposição, mesmo quando analisados nas concentrações máximas. O único composto que apresentou efeito bacteriostático foi o ZnAl MBT LDH na concentração de 33,3 mg/L contra *V. parahaemolyticus* e *B. cereus*.

Também foram realizados os ensaios antimicrobianos com os compostos orgânicos, que não apresentaram nível de toxicidade aparente (Tabela 1).

Composto (mg/L)	<i>V. aestuarinus</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>B. pumilus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
MBT	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ZnAl MBT LDH	>100	>100	<100	>100	<100	>100	>100	>100
MgAl MBT LDH	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ZnAl LDH	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
MgAl LDH	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Gluconato de Sódio SG	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ZnAl LDH SG	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NO ₂	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ZnAl LDH NO ₂	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) dos compostos MBT, ZnAl MBT LDH, MgAl MBT LDH, ZnAl LDH, MgAl LDH, SG, ZnAl-LDH-SG, NO₂, ZnAl LDH NO₂, contra *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio aestuarinus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Após serem normalizados, os dados foram submetidos ao teste post-hoc de Dunn. Dessa forma, os valores de IC50 foram calculados apenas na concentração e no composto que apresentou um efeito observado considerado significativo, sendo apenas o composto ZnAl LDH MBT na concentração de 100 mg/L (Tabela 2).

Organismo	<i>V. aestuarinus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. pumilus</i>
IC50% (ZnAl-LDH-MBT 100 mg/L)	151,179	129,219	103,726	151,179

Tabela 2. Indica valores de concentração inibitória do nanocomposto cujo efeito observado atingiria 50% das amostras bacterianas.

A ação biocida do MBT é reportada para diversos organismos, porém sua toxicidade para bactérias encontra-se em valores acima de 100 mg/L. De Wever *et al.* [47] destacam que o método de ação está associado com concentrações mais elevadas. Os resultados corroboram com o uso do LDH para liberação moderada de biocidas anticorrosivos bem como sua compatibilidade biológica, entretanto, seu grau de intensidade de efeitos antimicrobianos pode não estar correlacionado de forma direta com o mecanismo de liberação, por conta da sobreposição de outros fatores relacionados ao ambiente e ao estresse químico [21].

Peng *et al.* [48], demonstraram que o nanorevestimento de MgAl LDH agiu de forma promissora tanto na melhora da corrosão como na biocompatibilidade, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* e analisando curvas de polarização, proliferação celular, testes de hemólise, entre outros. Isto corrobora o fato dos compostos não terem apresentado toxicidade. Já Eduok *et al.* [49], identificaram ação biocida do MBT sobre as culturas de bactérias redutoras de sulfato, ao mesmo tempo em que frearam o processo corrosivo. Essa pesquisa, por sua vez, difere do resultado obtido aqui, onde o MBT só apresentou alguma inibição quando encapsulado com ZnAl LDH na concentração mais alta.

6. CONCLUSÃO

Foram avaliados 9 compostos anticorrosivos, imobilizados em LDH e seus respectivos precursores, quanto a capacidade de inibir o crescimento de 4 bactérias marinhas. De acordo com os resultados obtidos, nenhum dos compostos apresentou efeito bactericida. O composto ZnAl LDH MBT, nas concentrações de 33,3 e 100 mg/L, foi o único que apresentou atividade bacteriostática.

É possível inferir que os anticorrosivos de nova geração concentram sua aplicabilidade e eficácia numa ação em que o objetivo é o controle químico da corrosão, sem interferir de modo agressivo nas comunidades microbiológicas existentes. Porém, faz-se necessária uma investigação mais aprofundada sobre o tema, para buscar entender os efeitos crônicos dos anticorrosivos em sistemas mais complexos e dinâmicos e considerando fatores bióticos e abióticos do ambiente marinho, por exemplo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zhang, C., Zhang, B., Yuan, W., Yang, O., Liu, Y., He, L., Zhao, Z., Zhou, L., Wang, J., Wang, Z.L. (2022). Seawater-based triboelectric nanogenerators for marine anticorrosion. *CS Appl. Mater. Interfaces.*, 14: 8605-8612.
- [2] Veedu, K.K., Mohan, S., Somappa, S.B., Gopalan, N.K. (2022). Eco-friendly anticorrosive epoxy coating from *Ixora* leaf extract: A promising solution for steel protection in marine environment. *J. Clean. Prod.*, 340: 130750.
- [3] Mohammad, Y., Faisal, K., Rouzbeh, A., Noor, Q., Homero, C.L. (2022). A review of risk-based decision-making models for microbiologically influenced corrosion (MIC) in offshore pipelines. *Reliab. Eng. & Syst. Saf.*, 223: 108474.
- [4] Yuxuan, Z., Jiaqi, H., Li, Z., Zhengyu, J., Haixian, L., Lan, L., Zhizeng, G., Guozhe, M., Hongfang, L., Hongwei, L. (2022). Corrosion of aluminium alloy 7075 induced by marine *Aspergillus terreus* with continued organic carbon starvation. *NPJ Mat. Degrad.*, 6: 27.
- [5] Yang, L., Chengyun, N. (2019). Latest research progress of marine microbiological corrosion and biofouling, and new approaches of marine anti-corrosion and anti-fouling. *Bioact. Mater.*, 4: 189-195.
- [6] Yen, T.H.D., Aoife, P., Daniel, C., Khuong, B.D., Binh, S.H., Adam, K., Jitraporn, V., Vi, K.T. (2022). Analytical Characterisation of Material Corrosion by Biofilms. *J. Bio. Tribo. Corros.*, 8: 50.
- [7] Yan, M., Yimeng, Z., Ruiyong, Z., Fang, G., Baorong, H., Jizhou, D. (2020). Microbiologically influenced corrosion of marine steels within the interaction between steel and biofilms: a brief view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104: 515-525.
- [8] Tuck, B., Watkin, E., Somers, A., Machuca, L.L. (2022). A critical review of marine biofilms on metallic materials. *Npj. Mater. Degrad.*, 6: 25.
- [9] Houston, T.X., Jacobson, G. (2016). International measures of prevention, application and economics of corrosion technologies study. NACE International.
- [10] Deli, C., Jinyi, W., Ke, C. (2021). Microbiologically influenced corrosion behavior of carbon steel in the presence of marine bacteria *Pseudomonas* sp. and *Vibrio* sp. *ACS Omega.*, 6, 5: 3780-3790.
- [11] Gaylarde, C., Little, B. (2022). Biodeterioration of stone and metal - fundamental microbial cycling processes with spatial and temporal scale differences. *Sci. Total Environ.*, 823: 153193.
- [12] Masoumeh, M., Yi, Y., Dake, X., Zhenlun, S., Fuhui, W. (2021). Interspecies interactions of *Vibrio azureus* and *Jeotgalibacillus alkaliphilus* on corrosion of duplex stainless steel. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 160: 105212

- [13] Li, C., Wu, J., Zhang, D., Wang, P., Sun, Z., Zhu, L., Gao, Y., Wan, Y., Yang, Z., Wang, Y., Li, E. (2022). Alternate immersion improves corrosion inhibition efficiency of *Halomonas titanicae* towards EH40 steel. *Corros. Sci.*, 206:110503.
- [14] Wan, H., Song, D., Zhang, D., Du, C., Xu, D., Liu Z., Ding D., Li, X. (2018). Corrosion effect of *Bacillus cereus* on X80 pipeline steel in a Beijing soil environment. *Bioelectrochemistry.*, 121: 18-26.
- [15] Guo, Z., Pan, S., Liu, T., Zhao, Q., Wang, Y., Guo, N., Chang, X., Liu, T., Dong, Y., Yin, Y. (2019). *Bacillus subtilis* inhibits *Vibrio natriegens*-induced corrosion via biomineralization in seawater. *Front. Microbiol.*, 10.
- [16] Shen, Y., Dong, Y., Yang, Y., Li, Q., Zhu, H., Zhang, W., Dong, L., Yin, Y. (2020). Study of pitting corrosion inhibition effect on aluminium alloy in seawater by biomineralized film. *Bioelectrochemistry*, 132:107408.
- [17] Wu, J., Zhang, D., Wang, P., Cheng, Y., Sun, S., Sun, Y., Chen, S. (2016). The influence of *Desulfovibrio* sp. and *Pseudoalteromonas* sp. on the corrosion of Q235 carbon steel in natural seawater. *Corros. Sci.*, 112: 552-562.
- [18] Lou, Y., Chang, W., Cui, T., Wang, J., Qian, H., Ma, L., Hao, X., Zhang, D. (2021). Microbiologically influenced corrosion inhibition mechanisms in corrosion protection: A review. *Bioelectrochemistry*, 141:107883.
- [19] Veedu, K. K., Mohan, S., Somappa, S. B., Gopalan, N. K. (2022). Eco-friendly anticorrosive epoxy coating from *Ixora* leaf extract: a promising solution for steel protection in marine environment. *J. Clean. Prod.*, 350:130750.
- [20] Bouali, A. C., Serdechnova, M., Blawert, C., Tendim, J., Ferreira, M. G. S., Zheludkevich, M. L. (2020). Layered double hydroxides (LDHs) as functional materials for the corrosion protection of aluminium alloys: A review. *Appl. Mater. Today.*, 21:100857.
- [21] Kuznetsova, A., Domingues, P. M., Silva, T., Almeida, A., Zheludkevich, M. L., Tedim, J., Ferreira, M. G. S., Cunha, A. (2017). Antimicrobial activity of 2-mercaptobenzothiazole released from environmentally friendly nanostructures layered double hydroxides. *J. Appl. Microbiol.*, 122(5): 1207-1218.
- [22] Cao, Y., Zheng, D., Zhang, F., Pan, J., Lin, C. (2022). Layered double hydroxide (LDH) for multi-functionalized corrosion protection of metals: A review. *J. Mater. Sci. Technol.*, 102:232-263.
- [23] Wang, J., Du, M., Li, G., Shi, P. (2022). Research progress on microbiological inhibition of corrosion: A review. *J. Clean. Prod.*, 373:133658.
- [24] Cheng, S., Tian, J., Chen, S., Lei, Y., Chang, X., Liu, T., Yin, Y. (2009). Microbially influenced corrosion of stainless steel by marine bacterium *Vibrio natriegens*: (I) Corrosion behavior. *Mater. Sci. Eng. C.*, 29:751-755.

- [25] Noyel, V. S., Sharma, A., Manivannan, R. (2021). Metal corrosion induced by microbial activity-Mechanism and control options. J. Indian Chem. Soc., 98:100083.
- [26] Little, B. J., Blackwood, D. J., Hinks, J., Lauro, F. M., Marsili, E., Okamoto, A., Rice, S. A., Wade, S. A., Flemming, H. C. (2020). Microbially influenced corrosion - Any progress?. Corros. Sci., 170:108641.
- [27] Loto, C. A. (2017). Microbiological corrosion: mechanism, control and impact - a review. Int. J. Adv. Manuf. Technol., 92: 4241-4252.
- [28] D'Agostino, F., Morandi, M. A. B. (2009). Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. Inserido em Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, cap. 20, ISBN: 978-85-85771-47-8.
- [29] Sharma, R., Jasrotia, T., Umar, A., Sharma, M., Sharma, S., Kumar, R., Alkhanjaf, A. A. M., Vats, R., Beniwal, V., Kumar, R., Singh, J. (2022). Effective removal of Pb(II) and Ni(II) ions by *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus*: An experimental and mechanistic approach. Environ. Res., 212B: 113337.
- [30] Vejar, N., Gutiérrez, S., Tareelap, N., Alvarado, C., Solís, R., Guerra, C., Pineda, F., Sancy, M., Páez, M. (2022). Influence of *Bacillus safensis* and *Bacillus pumilus* on the electrochemical behavior of 2024-T3 aluminum alloy. Bioelectrochemistry, 143: 107950.
- [31] Silveira, D. R., Milan, C., Rosa, J. V., Timm, C. D. (2016). Fatores de patogenicidade de *Vibrio spp.* de importância em doenças transmitidas por alimentos. Arq. Inst. Biol., 83.
- [32] Gao, Y., Feng, D., Moradi, M., Yang, C., Jin, Y., Liu, D., Xu, D., Chen, X., Wang, F. (2021). Inhibiting corrosion of aluminum alloy 5083 through *Vibrio* species biofilm. Corros. Sci., 180: 109188.
- [33] Feng, Y., Chen, S., Zhang, H., Li, P., Wu, L., Guo, W. (2006). Characterization of iron surface modified by 2-mercaptobenzothiazole self assembled monolayers. Appl. Surf. Sci., 253: 5, 2812-1219.
- [34] Azam, M., A., Suresh, B. (2012). Biological activities of 2-mercaptobenzothiazole derivatives: a review. Sci. Pharm., 80: 4, 789-824.
- [35] Wever, H. D., Neste, S. V., Verachtert, H. (1997). Inhibitory effects of 2-mercaptobenzothiazole on microbial growth in a variety of trophic conditions. Environ. Toxicol. Chem., 16: 5, 843-848.
- [36] Franchini, C., Muraglia, M., Corbo, F., Florio, M. A., Mola, A. D., Rosato, A., Matucci, R., Nesi, M., Bambeke, F., Vitali, C. (2009). Synthesis and biological evaluation of 2-mercapto-1,3-benzothiazole derivatives with potential antimicrobial activity. Arch. Pharm., 342: 10, 605-613.

- [37] Maia, F., Silva, A. P., Fernandes, S., Cunha, A., Almeida, A., Tedim, J., Zheludkevich, M. L., Ferreira, M. G. S. (2015). Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications. *J. Chem. Eng.*, 270: 150-157.
- [38] Tedim, J., Poznyak, S. K., Kuznetsova, A., Raps, D., Hack, T., Zheludkevich, M. L., Ferreira, M. G. S. (2010). Enhancement of active corrosion protection via combination of inhibitor-loaded nanocontainers. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2: 5, 1528-1535.
- [39] Jin, W., Lee, D., Jeon, Y., Park, D. H. (2020) Biocompatible Hydrotalcite Nanohybrids for Medical Functions. *Minerals*, 10: 172.
- [40] Poznyak, S. K., Tedim, J., Rodrigues, L. M., Salak, A. N., Zheludkevich, M. L., Dick, L. F. P., Ferreira, M. G. S. (2009). Novel inorganic host layered double hydroxides intercalated with guest organic inhibitors for anticorrosion applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 1: 10, 2353-2362.
- [41] Zheludkevich, M. L., Tedim, J., Ferreira, M. G. S. (2012). “Smart” coatings for active corrosion protection based on multi-functional micro and nanocontainers. *Electrochim. Acta*, 82: 314-322.
- [42] Sun, X., Neuperger, E., Dey, S. (2015). Insights into the synthesis of layered double hydroxide (LDH) nanoparticles: Part 1. Optimization and controlled synthesis of chloride-intercalated LDH. *J. Colloid Interface Sci.*, 459: 264-272.
- [43] Montemor, M. F. (2014). Functional and smart coatings for corrosion protection: A review of recent advances. *Surf. Coat. Technol.*, 258: 17-37.
- [44] Hang, T. T. X., Truc, T. A., Duong, N. T., Vu, P. G., Hoang, T. (2012). Preparation and characterization of nanocontainers of corrosion inhibitor based on layered double hydroxides. *Appl. Clay Sci.*, 67: 68, 18-25.
- [45] Zhang, X., Zhao, S., Gao, J., Lei, Y., Yuan, Y., Jiang, Y., Xu, Z., He, C. (2019). Microbial action and mechanisms for Cr(IV) removal performance by layered double hydroxide modified zeolite and quartz sand in constructed wetlands. *J. Environ. Manage.*, 246: 636-646.
- [46] Maier, R. M., Pepper, I. L. (2015). Chapter 3 - Bacterial growth. *Environ. Microbiol.*, p. 37-56.
- [47] De Wever, H., De Moor, K., Verachtert, H. (1994). Toxicity of 2-mercaptobenzothiazole towards bacterial growth and respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, p. 631-635.
- [48] Peng, F., Li, H., Wang, D., Tian, P., Tian, Y., Yuan, G., Xu, D., Liu, X. (2016). Enhanced corrosion resistance and biocompatibility of magnesium alloy by Mg-Al-Layered double hydroxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8:51, p. 35033-35044.

[49] Eduok, U., Faye, O., Szunar, J. (2018). Effect of benzothiazole biocide on SRB-induced biocorrosion of hot-dip galvanized steel. *Eng. Fail. Anal.*, 93, p. 111-121.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: CLÁUDIA DE LIMA RAMOS AQUAROLI

Título: "Toxicidade de compostos anticorrosivos de nova geração contra bactérias marinhas."

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	A PROVA DA
MSC. Ingrid Padovese Zwar	APROVADA
MSC. Bruna Marques Ribeiro	APROVADA

PARECER:

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Cláudia de Lima Ramos Aquaroli** obteve o seguinte conceito:

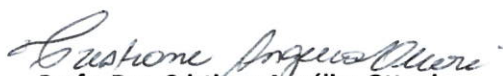


APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 27 de janeiro de 2023.


Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni


MSC. Ingrid Padovese Zwar


MSC. Bruna Marques Ribeiro