



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) BR 10 2012 033484-4 A2

(22) Data de Depósito: 28/12/2012
(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)



(51) Int.Cl.:
A01N 65/44
A01P 1/00
C02F 1/00
C02F 1/50

(54) Título: MÉTODO DE REMOÇÃO E PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

(73) Titular(es): Petróleo Brasileiro S/A - PETROBRAS, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Arie Fitzgerald Blank, Celuta Sales Alviano, Daniela Sales Alviano, Elisa Korenblum, Fernanda de Avila Abreu, Fátima Regina de Vasconcelos Goulart da Silva, Gina Vazquez Sebastian, Igor de Almeida Rodrigues, Lucy Seldin, Péricles Barreto Alves, Ulysses Garcia Casado Lins, Fernanda de Avila Abreu

(57) Resumo: MÉTODO DE REMOÇÃO E PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS). A presente invenção propõe o uso do óleo de capim limão ou do seu principal constituinte monoterpênico, o citral, no controle do processo de biocorrosão e acidulação biogênica causada pelo crescimento e formação de biofilme de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

MÉTODO DE REMOÇÃO E PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se aplica no campo da microbiologia, mais especificamente no ramo do controle do processo de biocorrosão e acidulação biogênica, e propõe um método de remoção e prevenção da formação de biofilme formado por bactérias redutoras de sulfato (BRS) pelo uso do óleo de capim limão ou do seu principal constituinte monoterpênico, o citral.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A produção biogênica do gás sulfeto de hidrogênio (H_2S), também denominada acidulação biogênica, é um dos maiores problemas da indústria de petróleo e gás. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são as maiores responsáveis por este problema, sobretudo aquelas pertencentes ao gênero *Desulfovibrio*.

O H_2S reduz a qualidade do óleo, promove a corrosão de ligas metálicas e pode causar entupimentos de dutos pela formação de sulfetos ferrosos insolúveis, promovendo, assim, a baixa eficiência na recuperação do petróleo. Além disso, a acidulação biogênica em instalações petrolíferas também implica em custos adicionais para o controle da exposição dos operadores ao H_2S .

A acidulação biogênica é caracterizada pelo aumento da concentração do H_2S na produção total do gás, tipicamente após o início da recuperação secundária do petróleo pela injeção de água.

A água produzida é um subproduto de descarte resultante da separação do óleo, gás e água de uma instalação de produção petrolífera, sendo uma mistura de água de formação e água de injeção, a qual contém óleo, sais, compostos químicos, sólidos e metais.

Além disso, a água produzida sempre contém uma alta densidade de células viáveis de BRS, as quais encontram um ambiente adequado

para seu crescimento na presença de compostos orgânicos e sulfato, bem como em temperaturas inferiores a 80°C.

5 A corrosão é uma das principais causas de falha em tubulações e dos custos de operação e manutenção para controle e prevenção da acidulação biogênica e da biocorrosão em diversas indústrias.

A corrosão relacionada às BRS está, invariavelmente, associada à formação de biofilmes em superfícies metálicas, sendo que condições anaeróbicas locais favoráveis ao crescimento dessas bactérias podem surgir na forma de consórcios microbianos mistos em sistemas industriais.

10 O padrão de corrosão característico da ação das BRS sobre o aço é a corrosão localizada, também denominada pites (do inglês pitting). Os pites formados são preenchidos por produtos de corrosão de cor negra, na forma de sulfetos de ferro. A taxa e a extensão dos processos de corrosão são criticamente afetadas pela natureza química e física dos produtos de
15 corrosão precipitados e pelo acesso de oxigênio ao sistema.

Substâncias poliméricas extracelulares sintetizadas por diferentes cepas de BRS também podem contribuir para o processo de corrosão, não somente por facilitar a adesão celular irreversível e colonização das superfícies metálicas, como também por suas características de ligação a
20 íons metálicos.

O tratamento comumente utilizado para o controle do crescimento de BRS é pela inibição de qualquer atividade biológica ou pela prevenção do grupo de BRS especificamente.

Considerando a primeira opção de tratamento, a prevenção do início
25 da acidulação biogênica com agentes biocidas é o método mais comum. No segundo caso, o tratamento pode envolver a eliminação de sulfato da fonte de água através de nanofiltração, que apresenta elevado custo para uma aplicação em larga escala, ou o estímulo da competição microbiana pela adição de compostos termodinamicamente mais favoráveis, tais como
30 o oxigênio, nitrato e nitrito.

Biocidas como glutaraldeído, sal de amônio quaternário e sulfato de tetraquis-hidroxi-metil-fosfônio (THPS), assim como misturas destes, são comumente utilizados.

5 No entanto, as BRS possuem sensibilidades diferentes aos biocidas quando comparadas a outros grupos bacterianos, devido, principalmente, ao crescimento das mesmas em biofilmes e a possível inativação dos biocidas após a reação com tais biofilmes e minerais.

Além disso, esses biocidas são recalcitrantes e levam a problemas ambientais severos, podendo causar corrosões quando aplicados em altas doses. Ainda, não são seletivos, podendo matar membros da comunidade bacteriana que oferecem proteção contra a corrosão e, após serem decompostos, podem deixar substratos adicionais a BRS, podendo o crescimento de bactérias indesejáveis duplicar ou triplicar após a remoção do biocida.

15 O óleo de capim limão (*Cymbopogon citratus*) e seu principal componente monoterpênico, o citral, são conhecidos por sua ação antimicrobiana e são muito usados em formulações antissépticas por serem compostos não tóxicos ao homem, além de serem hipoalergênicos.

O documento de anterioridade US 2010/284943 A1 se refere a 20 formulações com ação biocida e de remoção de biofilme, as quais compreendem extratos de plantas e pelo menos um óleo vegetal.

O documento de anterioridade US 6,267,897 B1 descreve a inibição da formação de biofilme em sistemas de água comercial e industrial por meio da adição de pelo menos um óleo vegetal.

25 O documento BR 1004423 A2 se refere a aditivos anti-incrustação inovadores e o uso destes em sistemas de revestimento para a prevenção de incrustação submersa de superfícies de objetos os quais estão em contato ou entram em contato com água.

Assim sendo, a presente invenção propõe o uso do óleo de capim 30 limão ou do seu principal constituinte monoterpênico (citral) no controle do

processo de biocorrosão e acidulação biogênica causada pelo crescimento e formação de biofilme de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

A presente invenção confere um tratamento não tóxico e eficiente para o controle de biocorrosão e acidulação biogênica nas indústrias, com proporcionando uma eficiente inibição do crescimento de (BRS).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método de remoção e prevenção da formação de biofilme de bactérias redutoras de sulfato (BRS) compreendendo a aplicação do óleo essencial de capim limão ou do citral em concentrações superiores a $0,17 \text{ mg.ml}^{-1}$ no afluente ou efluente industriais ou em superfícies sujeitas à corrosão.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma representação gráfica da microtitulação do óleo essencial de capim limão para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) contra a bactéria *Desulfovibrio alaskensis*.

A Figura 2 é uma representação gráfica do efeito do tratamento em diferentes concentrações do óleo essencial de capim limão sobre a cultura de *D. alaskensis*. Nesse caso foi utilizado o gene *dsr* (que codifica a enzima sulfito redutase dissimilativa) como marcador da presença de (BRS) e a técnica de (PCR) (reação em cadeia da polimerase) em tempo real.

A Figura 3 é uma representação gráfica do efeito do óleo essencial de capim limão nas concentrações MIC, sub-MIC, supra-MIC e controle contra o biofilme pré-formado de *D. alaskensis*.

A Figura 4 é uma representação gráfica da formação de biofilme por células de *D. alaskensis* pré-tratadas com óleo essencial de capim limão nas concentrações MIC, sub-MIC, supra-MIC e controle.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção propõe um método de remoção e prevenção da formação de biofilme de bactérias redutoras de sulfato (BRS), tal como

Desulfovibrio alaskensis, pelo uso do óleo de capim limão ou do seu principal constituinte monoterpênico (citral).

Esta invenção se aplica em diferentes áreas industriais (indústrias químicas e petroquímicas, indústria de papel e celulose), bem como no
5 tratamento de esgoto doméstico e de efluentes industriais.

Exclusivamente, a presente invenção refere-se à aplicação do óleo essencial de capim limão ou do citral para inibir a biocorrosão de superfícies de sistemas, tanques, equipamentos e bancadas, podendo essas serem metálicas (tais como aço inox, aço carbono, ferro, alumínio,
10 titânio, cobre, dentre outras), de vidro ou de plástico, de diferentes indústrias e o controle da acidulação biogênica na indústria de petróleo e em estações de tratamento. Além disso, o óleo essencial de capim limão pode ser aplicado em superfícies de vidro ou de plástico.

A concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de capim
15 limão ou citral, definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano, foi determinada em meio líquido Postgate E através da adição ao meio da estirpe Desulfovibrio alaskensis e do óleo essencial de capim limão e do citral purificado e diluído em tampão redutor, Tioglicolato de sódio 100 mM; ácido ascórbico 0,5 mM;
20 Resazurina 4 µM; NaCl 1M, com o objetivo de manter as condições de anaerobiose do meio, em concentrações que variam de 0,08 mg.ml⁻¹ a 6,0 mg.ml⁻¹.

As figuras 1 e 2 mostram o efeito das diferentes concentrações de capim limão no crescimento da D. alaskensis.

25 O óleo essencial de capim limão e o citral apresentam propriedades anti-incrustantes e antimicrobianas capazes de matar bactérias redutoras de sulfato (BRS) em concentrações superiores a 0,17 mg.ml⁻¹ com ação instantânea.

Além disso, os mesmos são ainda capazes de remover e impedir o
30 desenvolvimento de biofilmes formados por (BRS), sobre superfície de

vidro e metálica nas mesmas concentrações, através da aplicação em batelada ou contínua em afluentes ou efluentes industriais a serem tratados ou pelo condicionamento da superfície em questão.

TESTES REALIZADOS

5 Inibição da formação e remoção de biofilme pelo uso do óleo essencial de capim limão e do citral contra (BRS) sobre superfície de aço carbono:

Para determinar a atividade inibitória do óleo essencial de capim limão ou de citral sobre a formação, estabilidade e inativação do biofilme de *D. alaskensis*, foram realizados dois ensaios diferentes.

No ensaio A, avaliou-se a atividade do óleo durante a formação de biofilme. Para tal fim, numa placa de 24 poços contendo cupom de aço carbono como suporte para formação de biofilme, foi colocado o óleo essencial de capim limão nas concentrações MIC (0,17 mg.ml⁻¹), sub-MIC (0,085 mg.ml⁻¹), supra-MIC (0,34 mg.ml⁻¹) e controle (sem capim limão), e uma cultura de *D. alaskensis* (10⁷ células por cupom), em triplicata. A incubação se deu a 32°C por 7 dias, em condições de anaerobiose.

No ensaio B, avaliou-se o efeito do óleo essencial de capim limão sobre a formação de biofilme por células de *D. alaskensis* previamente tratadas com óleo essencial de capim limão, nas concentrações MIC, sub-MIC, supra-MIC e controle.

As células de *D. alaskensis* (10⁷ células.ml⁻¹) foram tratadas nas diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão e incubadas por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 1 ml de célula de cada tratamento (em triplicata) foi transferida para placa de 24 poços, contendo cupom de aço carbono como suporte para a formação de biofilmes. A incubação se deu a 32°C por 7 dias, em condições de anaerobiose.

Os cupons de aço carbono foram lavados com solução redutora e raspados para obter uma suspensão de células de cada tratamento. A suspensão foi incubada com iodeto de propídio a 0,1 mg.ml⁻¹ e laranja de

acridina a 30 mg.ml^{-1} por 30 minutos a 4°C , e, então, lavadas e fixadas em paraformaldeído a 2%, diluído em tampão fosfato salino de pH 7,4 (PBS), por 30 minutos a 4°C . Em seguida, as mesmas foram lavadas e incubadas com dihidro cloreto 4',6-diamino-2-fenilindol diluído 1:1000 em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após o término da marcação com as sondas fluorescentes, as células foram filtradas e lavadas sequencialmente com solução redutora. Uma gota de 5 μl de solução de diazabicyclo[2.2.2]octano a 1% em glicerol foi colocada sobre os filtros e montada entre lâmina e lamínula de vidro, com o objetivo de retardar a perda de fluorescência.

Análises quantitativas e qualitativas das células presentes nos biofilmes foram realizadas por microscópio de epifluorescência. As células coradas com diferentes sondas fluorescentes foram observadas e as imagens digitais foram obtidas aleatoriamente cobrindo uma área total de $0,15 \text{ mm}^2$ da lâmina de vidro.

A análise automática das imagens, juntamente com ajustes manuais, permitiu a contagem das células. Os valores das contagens (células aderidas. mm^{-2}) foram plotados em gráficos e o teste-t de Student foi realizado para revelar a influência das diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão na adesão da *D. alaskensis*.

As figuras 3 e 4 representam graficamente o efeito drástico do óleo essencial de capim limão sobre a formação e remoção de biofilmes de *D. alaskensis*, demonstrando o efeito deste composto tanto em células planctônicas quanto em células sésseis aderidas sobre uma superfície de aço carbono.

Caracterização morfológica do efeito do uso do óleo essencial de capim limão contra *Desulfovibrio alaskensis*:

A caracterização morfológica ultraestrutural do efeito causado pelo tratamento das células com óleo essencial de capim limão foi feita por microscopia eletrônica de transmissão.

Para tal fim, culturas puras de *D. alaskensis* tratadas com óleo essencial foram fixadas em solução 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M durante a noite a 4°C, lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas em solução 1% de OsO₄ em tampão cacodilato 0,1 M, lavadas no mesmo tampão, desidratadas em séries crescentes de acetona, incluídas em resina epoxi e polimerizadas a 60°C por 72 horas.

Os cortes ultrafinos foram obtidos em navalha de diamante em um ultramicrótomo e observados em microscópio eletrônico de transmissão. A amostra controle apresentou estrutura celular característica do grupo analisado.

No entanto, o tratamento com óleo essencial de capim limão causou alterações morfológicas facilmente identificáveis, como a presença de inúmeras inclusões citoplasmáticas elétron-densas de natureza desconhecida, de tamanho aproximado de 100 nm.

Inclusões em procariontes indicam desequilíbrio metabólico, o que sugere que o tratamento com o óleo essencial de capim limão influencia negativamente no crescimento celular.

Apesar de sutis, as alterações na parede celular também puderam ser observadas em uma parte das células, como a ausência de definição nas camadas descritas para bactérias Gram-negativas, como a membrana externa e periplasma.

Quando o óleo essencial de capim limão foi utilizado em maior concentração, houve perda considerável de conteúdo celular por grande parte das células, sugerindo morte celular.

25 Condicionamento da Superfície:

No estudo da influência do óleo essencial de capim limão na adesão de *D. alaskensis* à superfície de cupons de aço carbono, os cupons foram pré-tratados com óleo essencial nas concentrações MIC, sub-MIC, supra-MIC e controle.

30 O pré-tratamento (ou condicionamento) é realizado colocando os

cupons de aço carbono em placas de 24 poços contendo o óleo essencial nas várias concentrações, durante 24 horas.

Em seguida, os cupons são lavados com água destilada e secos ao ar e, após a secagem, realiza-se o teste de formação de biofilme com a cultura de *D. alaskensis* (10^7 células por cupom).

A incubação se dá a 32°C por 7 dias, em condições de anaerobiose. Não foi possível observar o crescimento, assim como a formação de biofilme sobre os cupons tratados com óleo essencial de capim limão em todas as concentrações testadas. Por outro lado, nos cupons controle observou-se a formação de um espesso biofilme negro.

Curva de morte da *D. alaskensis* por óleo essencial de capim limão nas concentrações MIC e sub-MIC:

O óleo essencial de capim limão e o citral purificado foram diluídos em tampão redutor para manter as condições de anaerobiose do meio. A curva de morte foi analisada dia a dia, utilizando 5 réplicas de cada concentração. Após o contato das células com o óleo essencial, essas células foram lavadas e transferidas para um tubo com meio fresco e incubadas em anaerobiose.

Os tubos com meio fresco apresentando crescimento bacteriano, foram considerados como resultado negativo para inibição de crescimento pelo óleo essencial de capim limão.

No entanto, não houve crescimento em nenhum dos tubos dos tratamentos. Após analisar o tubo no tempo zero (logo após o contato com o óleo essencial) e, em seguida, de hora em hora, observou-se um efeito instantâneo do óleo essencial sobre o crescimento das células de *D. alaskensis*.

REIVINDICAÇÕES

- 1- **MÉTODO DE REMOÇÃO E PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS),** caracterizado por compreender a aplicação do óleo essencial de capim limão ou do citral em concentrações superiores a $0,17 \text{ mg.ml}^{-1}$ no afluente ou efluente industrial ou de superfícies a serem tratadas.
- 5
- 2- **MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a superfície a ser tratada compreende superfícies de sistemas, tanques, equipamentos e bancadas de diferentes áreas industriais.
- 10
- 3- **MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a superfície é metálica, de vidro ou de plástico.
- 4- **MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a superfície metálica é de aço inox, aço carbono, ferro, alumínio, titânio ou cobre.
- 15
- 5- **MÉTODO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o óleo é aplicado em batelada ou contínuo no afluente ou efluente industrial a ser tratado.
- 6- **MÉTODO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a aplicação ainda é feita por
- 20
- condicionamento da superfície.

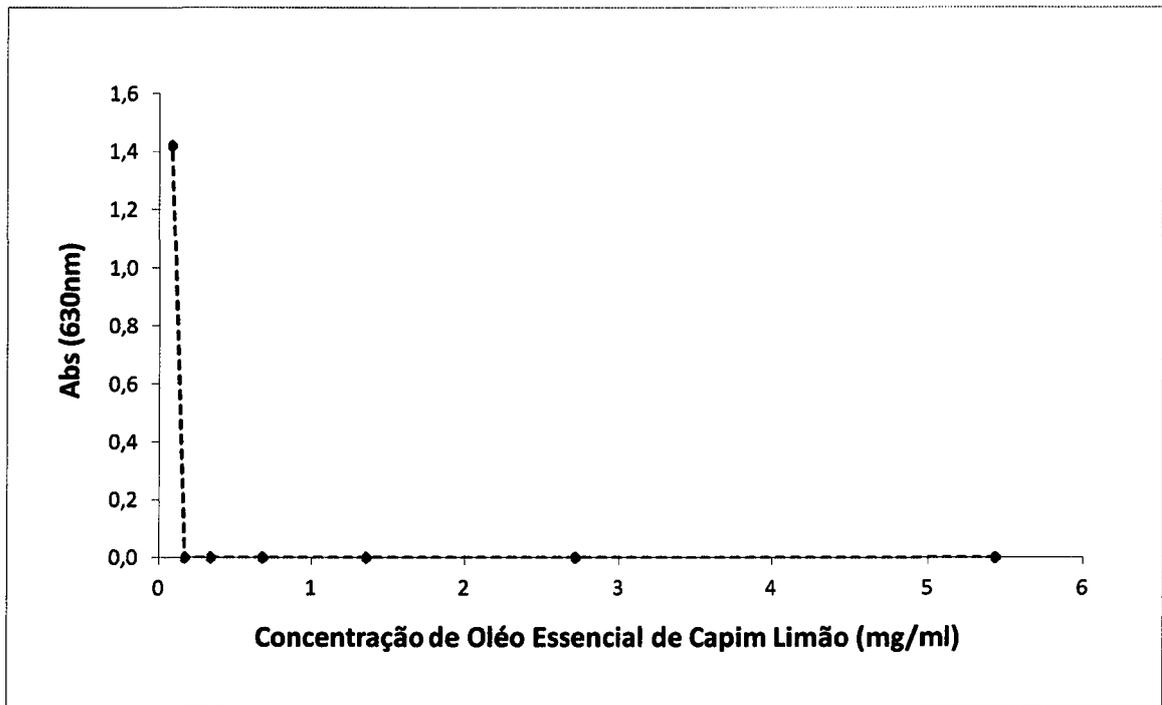


FIGURA 1

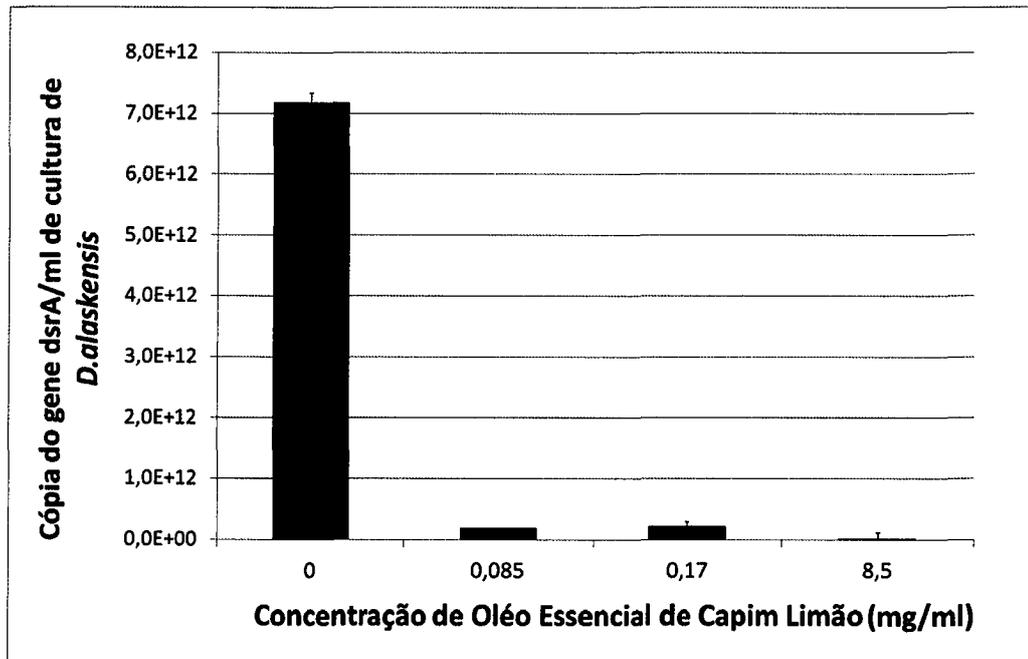


FIGURA 2

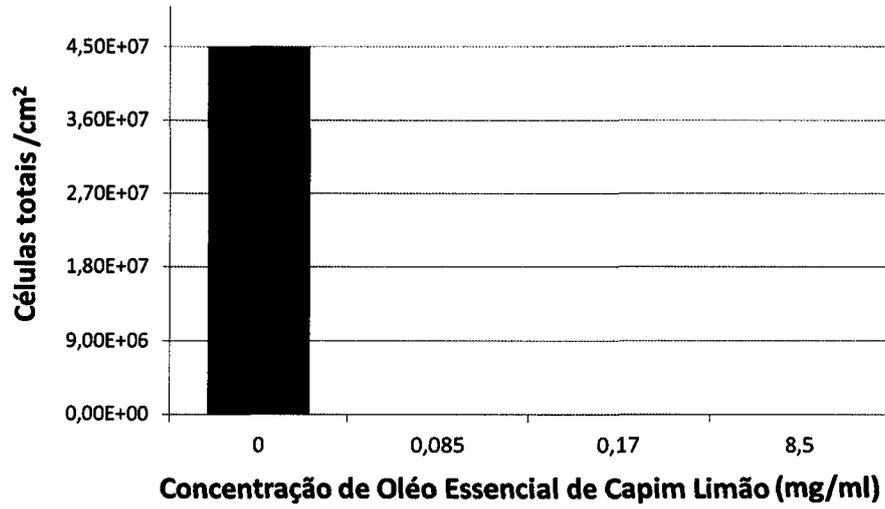


FIGURA 3

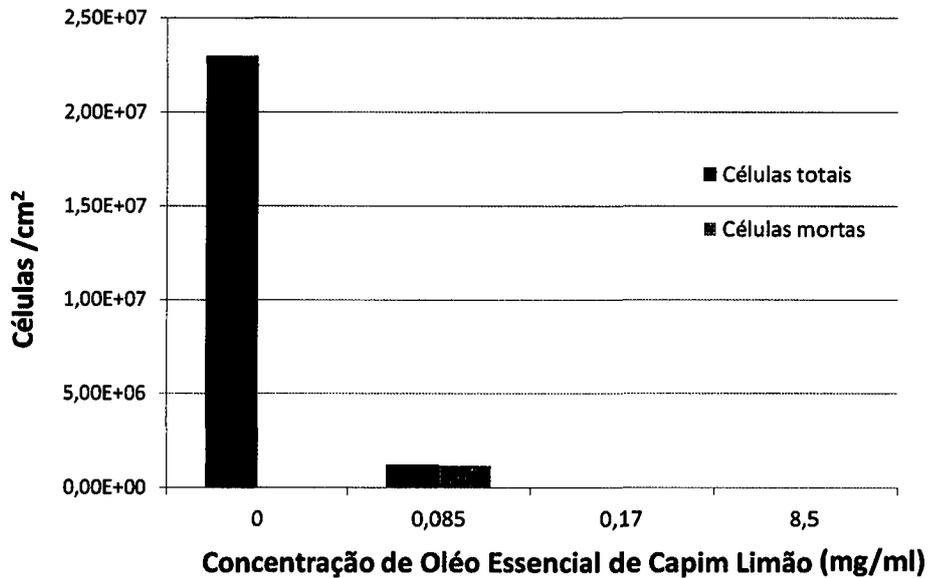


FIGURA 4

RESUMO

**MÉTODO DE REMOÇÃO E PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)**

A presente invenção propõe o uso do óleo de capim limão ou do seu principal constituinte monoterpênico, o citral, no controle do processo de biocorrosão e acidulação biogênica causada pelo crescimento e formação de biofilme de bactérias redutoras de sulfato (BRS).