



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Isolamento de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae),
avaliação do óleo essencial da planta e dos metabólitos dos endofíticos sobre a corrosão
microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020

Marcelino Gevilbergue Viana

Natal – RN

2017

MARCELINO GEVILBERGUE VIANA

**Isolamento de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer
(Verbenaceae), avaliação do óleo essencial da planta e dos metabólitos dos
endofíticos sobre a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono
AISI 1020**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Norte e Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do ponto focal Natal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Natal – RN

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Viana, Marcelino Gevilbergue.

Isolamento de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), avaliação do óleo essencial da planta e dos metabólitos dos endofíticos sobre a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020 / Marcelino Gevilbergue Viana. - Natal, 2017.

216 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

1. *Achaetomium lippae* - Tese. 2. Biocorrosão - Tese. 3. Endófitos - Tese. I. Santos, Everaldo Silvino dos. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 573.4

“À minha Mãe, grande ser de luz.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior desse mundo!

À minha família, pelo incentivo, compreensão e amor dedicados permanentemente.

Aos amigos Marcos Antônio, Daniel, Samuel, Ana Elvira e Jô, pelo companheirismo de cada dia.

Aos amigos do LEB Serginho, Francisco e Francinaldo, pelo apoio e força ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos, por aceitar o desafio e pela sua paciência em cada etapa desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Geclio Pereira da Silva por ceder gentilmente o uso do seu laboratório e equipamentos, bem como por suas orientações técnicas.

Ao aluno e amigo Josiel Nascimento pela inteira dedicação aos experimentos e por sempre estar à disposição.

Pelo apoio da amiga Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque, da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, pelo fornecimento das amostras da Lippia e pelo incentivo à consolidação desse trabalho.

À professora Dra. Vânia Sousa Andrade por ceder gentilmente o seu laboratório para isolamento e cultivo dos microrganismos e à aluna Ana Isa por me auxiliar nessa etapa.

À pesquisadora e amiga Dra. Márcia T. S. Lutterbach, do Instituto Nacional de Tecnologia – INT, pelo fornecimento das cepas ATCC e colaboração à pesquisa.

Ao Professor Dr. Antônio Gilberto Ferreira, da Universidade de São Carlos – UFSCAR, pelo auxílio na identificação química dos metabólitos.

Ao amigo Dr. Ewerton Richard pela ajuda nas análises químicas dos metabólitos e pelas contribuições aos artigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio a essa pesquisa.

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Essa tese está estruturada em forma de artigos científicos.

A lista de figuras, tabelas, siglas e abreviaturas referem-se às encontradas na introdução e na fundamentação teórica desse trabalho.

RESUMO

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) atinge todos os setores de produção da indústria de petróleo e gás e demanda expressivos gastos e investimentos para prevenção e controle. O objetivo dessa tese foi avaliar as atividades biocida e *antibiofouling* de metabólitos de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer como também do óleo essencial (puro e em sistema microemulsionado) dessa espécie sobre biofilmes microbianos em aço carbono 1020 AISI. Os experimentos utilizaram cupons de aço carbono 1020 AISI dispostos em *Erlenmeyers* e em sistema dinâmico para a obtenção dos biofilmes. A avaliação biocida dos metabólitos deu-se pela quantificação microbiana pelas técnicas de absorvância, do número mais provável (NMP), antes e após os tratamentos. Os tratamentos consistiram em: 0, 100, 150 e 200 µg/L de cada metabólito sobre biofilmes nos tempos de contato zero, duas, três e quatro semanas, com três repetições por tratamentos. A ação *antibiofouling* foi realizada pelo contato dos metabólitos na maior concentração (200 µg/L) com os biocupons antes da obtenção dos biofilmes. A ação antimicrobiana do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer na forma pura, e em sistema microemulsionado, foi avaliada pela quantificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS), oxidantes de ferro (BOF), fungos, bactérias aeróbias e anaeróbias totais, pelas técnicas de NMP, plaqueamento *pour plate*, espectrofotometria de massa (EM) e análise de micrografias realizadas antes e após os tratamentos. A atividade anticorrosiva foi avaliada por impedância e polarização eletroquímicas, testes gravimétricos (perda de massa e quantificação de *pites*) bem como pela obtenção de micrografias da superfície do aço carbono. Amostras de *L. gracilis* Schauer foram coletadas no município de Mossoró - RN e foram isolados fungos e bactérias das raízes e folhas. Uma nova espécie de fungo foi descoberta e identificada como *Achaetomium lippae*. Foram obtidos três metabólitos: dois de fungos e um de bactéria. Os resultados mostraram que houve diferença da atividade biocida e *antibiofouling* entre os metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer avaliados, sendo LGS-Rb1 o mais eficiente na maioria tipos microbianos testados, evitando a formação de *biofouling* e reduzindo a taxa de crescimento microbiano na maior concentração avaliada. Os ensaios eletroquímicos e gravimétricos mostraram que para todos os metabólitos houve variação na atividade anticorrosiva. O óleo essencial de *L. gracilis* Schauer avaliado *in natura* inibiu significativamente o crescimento *in vitro* de *C. bifermentans* e de fungos em biofilme, reduzindo sua taxa de crescimento a zero a partir de 20 µg.L⁻¹. Os ensaios eletroquímicos e gravimétricos mostraram que a concentração de 60 µg.L⁻¹ do óleo essencial foi eficiente na redução da corrosão. Nos ensaios usando o sistema microemulsionado o óleo essencial inibiu eficientemente o crescimento de BRS, BOF e fungos após 16 dias de contato e teve atividade *antibiofouling* após 96 horas de contato com os biocupons de aço carbono AISI 1020. Dessa forma os metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer bem como seu óleo essencial mostram-se como novas alternativas de biocidas naturais eficientes no controle da corrosão microbiologicamente induzida.

Palavras-chave: corrosão microbiologicamente induzida, metabólitos, endofíticos, *Achaetomium lippae*, óleo essencial, *L. gracilis* Schauer, biofilme.

ABSTRAC

The corrosion microbiologically induced (CMI) reaches all the sectors of production of the industry in Petroleum oil and Gas and demands expressive expensive and investments for prevention and control. The goal of this thesis was to evaluate the biocide and antibiofouling activities of secondary metabolites obtained from endophytic microorganisms of *Lippia gracilis* Schauer as well of the essential oil (pure and in microemulsified system) from this species on microbial biofilms in 1020 AISI carbon steel. The experiments for biocide activity used 1020 AISI carbon steel plate arranged in *Erlenmyers* and dynamic system with forced circulation for obtaining of the total biofilms from water produced by oil. The assessment for biocide of the metabolites from endophytic of *L. gracilis* Schauer resulted of the quantification of these species of bacteria in the quantification techniques by absorbance in more probable numbers (MPN), before and after the treatments, had been identified by gas chromatography coupled the spectrophotometry in mass (CG-MS) and magnetic resonance imaging (MRI) just those who demonstrated activities. The treatments consisted in evaluating the concentrations 0, 100, 150 and 200 µg/L in each metabolites on biofilms in times contact to zero, two, three and four weeks, with three repetition by treatments. The antibiofouling action was made in the contact of the metabolites in the highest concentration (200 µg/L) with the bioplates before being inserted into the dynamic system. The antimicrobial action of the essential oil *L. gracilis* Schauer in the pure form and in a microemulsified system was evaluated by the quantification bacteria reducer of sulphate (BRS), oxidant of iron (BOI), fungi, aerobic bacteria and total anaerobes by the techniques of dilution, platingpourplate, spectrophotometry in mass (MS) and micrographs analysis made before and after the treatments. The anticorrosive activity of all bioproducts was evaluated by electrochemical impedance and polarization, gravimetric examinations of mass loss and quantification of pites, as well in the obtaining of micrographs of the carbon steel's surface. Samples of *L. gracilis* Schauer were collected in the city of Mossoró - RN and were isolated fungi and bacteria from the roots and leaves. A new type of fungus was discovered and identified as *Achaetomium lippae*. Three metabolites were obtained: two fungi (LGS-Lf1 and LGS-Lf2, being "LGS" for *L. gracilis* Schauer, "L": leaf, "f": fungus and "R" for root) and one of bacteria (LGS-Rb1, being "LGS" for *L. gracilis* Schauer, "R": root and "b": bacterium). The results showed that there was a difference in the biocide activity and antibiofouling between the metabolites from endophytic of *L. gracilis* Schauer assessed, being just the LGS-Lf1 being efficient over all the microorganisms tested, avoiding the formation of biofouling on the surface of the material and reducing the rate of microbial growth at zero after 96 hours of contact at the highest concentration evaluated. The electrochemical and gravimetric tests displayed that for all the metabolites occurred change in the anticorrosive activity. The *L. gracilis* Schauer essential oil evaluated in the pure form inhibited significantly the growth in vitro of *C. bifermentans* and of fungi in biofilm, reducing their growth rate to zero as from 20 µg.L⁻¹. The electrochemical and gravimetric tests showed that the concentration of 60 µg.L⁻¹ of the essential oil was efficient in the reduction of corrosion. In the tests, using the microemulsified system, the essential oil inhibited the growth of BRS, BOF and fungi 16 days later in contact and had antibiofouling activity after 96 hours in contact with the AISI 1020 bioplates of carbon steel. Therefore, the metabolites from endophytic of *L. gracilis* Schauer as well its essential oil are shown as new alternatives of natural biocides efficient in the control of the corrosion microbiologically induced.

Key words: corrosion microbiologically induced, metabolites, endophytes, *Achaetomium lippae*, essential oil, *L. gracilis* Schauer, biofilm.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Fluxograma mostrando cada etapa experimental utilizada com os respectivos resultados gerados como proposta de artigos científicos...	20
Figura 2: Micrografia de biofilme formado em biocupom de aço carbono 1020 AISI mostrando algumas células bacterianas e o EPS. Aumento de 10703x. (Viana, 2009)..	26
Figura 3: Formação do biofilme: correlação entre a função sigmóide e as etapas de formação de biofilme. Adaptado de Stoodley & Dirckx (2003).	28
Figura 4: Etapas de formação de biofilme mostrando a prevalência de diferentes tipos microbianos de acordo com metabolismo da respiração. Adptado de Rendueles & Ghigo (2012)..	29
Figura 5: Influência do tipo de superfície na formação de biofilme. Adaptado de Rickard <i>et al.</i> , (2003).	31
Figura 6: Corrosão eletroquímica: ilustração da formação de <i>pitting</i> a partir da dissolução do aço carbono em meio aquoso. Fonte: Adaptado de Segui (2014). Micrografia óptica da superfície de aço carbono 1020 AISI mostrando a presença de pites. Fonte: autoria própria.	34
Figura 7: Processo de formação de biofilme e formação da célula de aeração diferencial. Adaptado de <i>Creative Commons Library, apud</i> de Sandle (2013).	38
Figura 8: Ocorrência de pites na superfície de biocupom: micrografia óptica de biocupom de aço carbono 1020 AISI mostrando a presença de múltiplos pites gerados pelo processo de CMI. Aumento de 10x. Fonte: autoria própria.	39
Figura 9: Etapa de desenvolvimento do biofilme considerando apenas a presença de dois tipos de microrganismos de acordo com seu metabolismo: microrganismos aeróbios, que utilizam o oxigênio com acceptor final de elétrons, e os anaeróbios, bactérias redutoras de sulfato (BRS). Adaptado de Franklin & Stewart (2008).	40
Figura 10: Etapa de desenvolvimento do biofilme destacando a presença das BPA: a produção de ácidos, como o HAC, pelas BPAs pode também auxiliar nas reações dos dois tipos de microrganismos já existentes. Adaptado de Franklin & Stewart (2008).	42
Figura 11: Etapa de desenvolvimento do biofilme destacando a presença das BOFe. Adaptado de Franklin & Stewart (2008).	44
Figura 12: Diagrama representativo do processo de biocorrosão segundo Beech <i>et al.</i> , (2005).	47
Figura 13: Domínios de distribuição do gênero <i>Lippia</i> no Brasil: prevalência exclusiva nos biomas Cerrado e Caatinga (Adaptado de Moraes <i>et al.</i> , 2009).	48
Figura 14: <i>Lippia gracilis</i> Schauer: (a) espécie em floração e (b) amostras de folhas retiradas para isolamento de microrganismos endofíticos (autoria própria).	50
Tabela 1: Estruturação dos artigos a partir dos objetivos propostos e metodologias adotadas.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
BOFe	Bactérias Oxidantes de Ferro
BOS	Bactérias Oxidantes de Sulfato
BPA	Bactérias Produtoras de Ácidos
BRN	Bactérias Redutoras de Nitrato
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
EPS	Substância Polimérica Extracelular - <i>Extracellular Polymeric Substance</i>
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
EPS	Substância Polimérica Extracelular - <i>Extracellular Polymeric Substance</i>
HAc	Ácido Acético
LAHs	Lactonas de N-acilhomoserina
pH	Potencial de Hidrogênio
MEV	Micrografia Eletrônica de Varredura
QS	<i>Quorum sensing</i>
TDC	Teoria da Despolarização Catódica

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</u>	x
<u>LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS</u>	xi
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	19
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	20
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
4.1. Biofilmes microbianos:	25
4.1.2. Definição de Biofilme	25
4.2. Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI) e Bioeletroquímica:	32
4.2.1. Corrosão inorgânica e Eletroquímica	33
4.2.2. Eletroquímica da CMI:	36
4.2.2.1. Aspectos gerais	36
4.2.3. Tipos de CMI	46
4.3. <i>Lippia gracilis</i> Schauer e suas propriedades	48
4.4. Microrganismos endofíticos e potencialidades	51
4.5. Gênero <i>Achaetomium</i> (<i>Chaetomiaceae</i>)	55
4.6. Produtos naturais no controle da CMI:	54
4.6.1. Metabólitos de microrganismos endofíticos: potencialidades para o controle de CMI	57
4.6.2. Uso de óleos essenciais no controle de CMI	59
4.7. Microrganismos endofíticos e a biossíntese de óleos essenciais	62
5. REFERÊNCIAS	65
6. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE:	86
6.1. Manuscrito I: <i>Achaetomium lippiae</i> , nova espécie de fungo endofítico de <i>L. gracilis</i> Schauer. Fungal Planet . Submetido em Julho de 2017.	87
6.2. Manuscrito II: Inibição da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020 mediada pela ação de metabólitos secundários de endofíticos de <i>Lippia gracilis</i> Schauer (<i>Verbeneaceae</i>). Revista sugerida: Corrosion Science	92

6.3. Manuscrito III: Atividade biocida de metabólitos secundários de endofíticos de <i>Lippia gracilis</i> Schauer sobre microrganismos em biofilme envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Revista sugerida: Symbiosis	130
6.4. Manuscrito IV: Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer on <i>Clostridium bifermentans</i> and fungal-containing biofilms. Microbiology Open . Submetido em Julho de 2017	163
6.5. Manuscrito V: Antibiofilm activity and biocorrosion control by means of essential oil from <i>Lippia gracilis</i> Schauer (<i>Verbenaceae</i>) microemulsion system. Journal of Materials Chemistry and Physics . Submetido: Julho de 2017.....	184
7. CONCLUSÕES GERAIS.	217

1. Introdução

A prospecção de inibidores de corrosão efetivos, comercialmente viáveis e ambientalmente aceitos, é algo bastante recorrente e necessário nos grandes setores industriais independente do tipo químico: sintéticos ou de origem natural. Em especial na indústria de petróleo e gás, a busca por novas substâncias cresce permanentemente sendo indispensável diante da ampliação desse setor, como também por sua vulnerabilidade a diferentes tipos de corrosão, que atinge direta ou indiretamente toda a cadeia produtiva. Dessa forma a expressiva necessidade de investimentos para recuperação de materiais e/ou sistemas que visa otimizar a produção decorrente dos danos dos vários tipos de corrosão vai ao encontro de busca de novas fontes, principalmente os biocidas de origem e bases naturais.

A corrosão é um processo natural de deterioração provocada por alterações físico-químicas internas e externas às propriedades padrões dos materiais, e que atinge diferentes setores industriais no mundo inteiro, provocando danos diretos e indiretos (Nunes, 2007; Gentil, 2011). Os gastos para prevenção e/ou controle representam atualmente milhões em investimentos, demandando orçamentos específicos e mão de obra especializada para o setor industrial em questão. Apenas na indústria petrolífera os gastos para recuperação de equipamentos e prevenção da corrosão nos países emergentes como o Brasil, por exemplo, representam cerca de 1 a 5% do total do Produto Interno Bruto (PIB) anual (ABRACO, 2016), tendendo a se potencializar quando as condições climáticas do país favorecem tipos de corrosão mais acentuados e difíceis de controlar.

A corrosão microbiologicamente induzida (*microbiologically-influenced corrosion* – MIC), ou biocorrosão, é um tipo especial de corrosão em que os microrganismos são protagonistas, influenciando ou agindo diretamente sob as condições químico-físicas dos materiais por formar, principalmente, uma célula de aeração diferencial, alterando assim a eletroquímica do processo (Koch, 2014). O diferencial nesse tipo de corrosão é a participação direta de uma ativa comunidade denominada de biofilme, que possui estratégias adaptativas peculiares e nicho ecológico bem compatível com as mais variáveis condições climáticas vigentes. Nos países tropicais, como é o caso do Brasil, as altas temperaturas e salinidade, além da grande quantidade de matéria orgânica absorvida ou dissolvida nas águas, são fatores que favorecem consideravelmente à proliferação de microrganismos em biofilmes (Felipe, 2012), ocorrendo a biocorrosão com maior prevalência, principalmente por ação de bactérias aeróbias, redutoras de sulfato (BRS) e oxidantes de ferro (BOF) e por fungos (Videla, 2003).

Diferentemente dos outros tipos a corrosão microbiológica ganha destaque por se iniciar em nível microscópico por ação puramente biológica, acelerando o processo natural de corrosão, e se intensificar em nível macroscópico de forma rápida e contínua. A dinâmica da comunidade microbiana dentro do biofilme favorece e apresenta características particulares, tornando difícil o controle da corrosão, e que conseqüentemente a acelera (Zuo, 2007; Hong *et al.*, 2012; Kip & Veen, 2015).

Devido à biocorrosão apresentar a propriedade de ter aspectos biológicos e químicos intimamente interligados, novas áreas de estudo surgem, combinadas com as grandes áreas já difundidas como a Microbiologia e a Química. A Ciência de materiais e a Biologia molecular e Genética têm dedicado atualmente grande interesse às pesquisas sobre biofilme e biocorrosão, permitindo novas descobertas e ampla fundamentação sobre o tema. Assim, contribuindo com formas de controle da biocorrosão a Química verde surge como área contemporânea da Química desenvolvendo biocidas “ecologicamente amigáveis”, de origem natural e com propriedades consideradas bastante efetivas. E complementando a expansão da Química verde, a Biotecnologia se destaca buscando novas estratégias e tecnologias de aplicação dessas substâncias, bem como novas bioformulações em substituição ao uso dos biocidas sintéticos.

A busca por novos biocidas, que não gera impacto ao ambiente, surge da amplitude de três grandes problemas: a frequência recorrente dos casos de biocorrosão nos mais diferentes setores, industriais principalmente; a pertinente resistência microbiana a alguns biocidas já evidenciados na indústria (Videla, 2003) e aos impactos ambientais sobre a flora e fauna decorrentes do descarte pós-aplicação, mas sem tratamento prévio (Ricklefs, 2011). Com base nessa problemática os produtos naturais estão sendo pesquisados como forma de substituição aos biocidas químicos ou até mesmo para atuarem em associação com esses. Produtos gerados ou derivados de plantas e de microrganismos podem representar uma excelente alternativa para a prevenção e/ou controle da biocorrosão, considerando a fácil obtenção, dentro de uma política sustentável e de manejo; o baixo preço na produção, a alta taxa de biodegradabilidade no ambiente e, principalmente, a efetividade dessas substâncias sobre biofilmes microbianos e no processo de corrosão (Patni *et al.*, 2013).

Em relação aos produtos obtidos a partir do metabolismo vegetal, os óleos essenciais constituem biocidas bastante efetivos e já são avaliados com intuito de controlar a corrosão inorgânica, como também microbiológica (Gualdrón *et al.*, 2013; Raut & Karuppayil, 2014). Na inibição da corrosão inorgânica as biomoléculas presentes nessas

substâncias atuam, geralmente adsorvendo-se sobre a superfície do metal, e formando uma película protetora denominada “filme” que evita a perda de elétrons do material (Maciel *et al.*, 1998). Já sobre a eficiência na redução da taxa de corrosão, nos casos de CMI, seu mecanismo de ação principal decorre da eliminação completa ou parcial da comunidade microbiana pela ação biocida, o que, conseqüentemente, reduz o processo corrosivo.

As propriedades de adsorção e interação com diferentes tipos de materiais e com o próprio meio passam a ser potencializadas quando os óleos essenciais são utilizados em sistemas microemulsionados – mistura isotrópica de água, óleo e surfactante, o que aumenta consideravelmente a solubilidade e a eficiência de suas propriedades, sejam elas biocida e/ou anticorrosiva, devido a maior estabilidade termodinâmica desse sistema (Karunaratne *et al.*, 2017). Assim a eficiência dos óleos essenciais em decorrência das já reconhecidas propriedades, antimicrobiana e anticorrosiva, incrementam a sua manipulação, seja em sistema microemulsionado ou não, como um possível biocida destinado à proteção contra a corrosão microbiológica para os mais variados setores industriais.

As biomoléculas obtidas a partir do metabolismo “não essencial” de microrganismos, os denominados metabólitos secundários, merecem também destaque dentro da variedade de bioprodutos pesquisados, por terem sua atividade antimicrobiana reconhecida com ação amplamente efetiva. Por outro lado, a obtenção de metabólitos derivados de microrganismos endofíticos com algum tipo de bioatividade ainda constitui algo relativamente novo (Araújo, 1996). Ao se considerar a prospecção dessas biomoléculas com objetivo de controle da corrosão microbiologicamente induzida tem-se algo inédito e bastante promissor.

Microrganismos endofíticos são principalmente bactérias e fungos que colonizam intra e/ou intercelularmente os tecidos saudáveis de plantas em algum tempo do seu ciclo de vida sem causar danos aparentes ou benefícios ao seu hospedeiro (Ryan *et al.*, 2008). Estes são reconhecidos no controle biológico de pragas e fitopatógenos, na produção de toxinas, antibióticos, enzimas e outros fármacos, ganhando grande importância na Biotecnologia como verdadeiras “biofábricas” (Melo & Azevedo, 1998; Kusari *et al.*, 2014). Todas essas potencialidades estimulam hoje a bioprospecção desses organismos para a obtenção de novas moléculas com finalidades diversas. Quando se considera que essas propriedades podem ser otimizadas, a partir da obtenção de endofíticos isolados de plantas de ambientes considerados de grande pressão adaptativa (Schulz & Boyle, 2005), há um aumento na busca por novas espécies desse tipo de microrganismo bem como na exploração desses ambientes,

evidenciando uma relevância ecológica antes não dada a esses ecossistemas, como é caso do bioma Caatinga, localizada na região Semiárida brasileira.

As espécies de plantas da Caatinga são bem adaptadas ao clima semiárido, possuindo características bem peculiares à falta de água e à temperatura elevada, fatores considerados relevantes às espécies, em termos de pressão adaptativa e que tornam esse bioma único no mundo (Prado, 2003). Diferentes tipos e espécies de microrganismos endofíticos já foram isolados de espécies nativas da Caatinga, entretanto ainda há poucos trabalhos relevando a importância desses microrganismos diante da grande biodiversidade da região. O gênero *Lippia* tem abrangência na África, Américas do Sul e do Norte, com grande predominância no Brasil. Possui distribuição na região Semiárida brasileira, com algumas espécies sendo essencialmente nativas do bioma Caatinga. A característica marcante das espécies desse gênero é a produção de óleos essenciais com várias propriedades medicinais já bem elucidadas na literatura, como é o caso de *Lippia gracilis* Schauer, espécie conhecida pelo amplo uso popular na forma de infusões, decocção, chás, entre outras (Mendes *et al.*, 2010).

Lippia gracilis Schauer, conhecida como “alecrim-da-chapada”, é um subarbusto pouco ramificado com ampla prevalência nos estados de Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte. É conhecida na medicina popular pela sua ação antimalária, antiúlcera, helmíntica, e, principalmente, por sua forte ação antimicrobiana relacionada ao seu óleo essencial (Pascual *et al.*, 2001; Albuquerque *et al.*, 2006), que já demonstrou possuir, na sua forma natural, atividade contra biofilmes (Viana, 2009). Porém, não há relatos do uso do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer, seja na sua forma natural ou em sistema microemulsionado, contra biofilmes microbianos geradores de corrosão como também não se conhece sua atividade anticorrosiva sobre diferentes tipos de materiais. No gênero *Lippia* alguns microrganismos endofíticos já foram isolados e identificados (Siqueira *et al.*, 2011). Porém, especificamente de *L. gracilis* Schauer, nenhum estudo foi realizado ainda com esse fim e, ainda, não se conhece quais gêneros e espécies estão presentes nessa planta bem como os tipos de biomoléculas que apresentem algum tipo de bioatividade, o que reforça a necessidade de tais estudos diante da importância dessa espécie.

O uso de produtos naturais para prevenção ou controle da biocorrosão não é algo novo (Guimet *et al.*, 2006), porém a prospecção de microrganismos endofíticos para obtenção de metabólitos com intuito de controlar a biocorrosão é pouco relatado na literatura, salvo os casos de uso de substâncias de microrganismos presentes em algas marinhas, que não

são considerados endofíticos, mas simbioses (Pietra, 1997). Dessa forma, acredita-se que a obtenção de metabólitos secundários de microrganismos endofíticos para fins de controle de biofilmes envolvidos no processo de biocorrosão e/ou redução na taxa de corrosão de diferentes materiais mostra-se como algo promissor. Tal fato baseia-se na possível efetividade desses compostos, na sua facilidade de obtenção, na alta taxa de rendimento no processo final de extração, no baixo custo de produção e por serem considerados ecologicamente “amigáveis” devido a sua rápida biodegradabilidade. Assim, todas essas vantagens surgem como pontos fortes para estimular o uso de óleos essenciais e à prospecção de endofíticos e seus metabólitos para o controle da biocorrosão.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Essa tese tem como objetivo principal prospectar microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer e avaliar a aplicação dos seus metabólitos juntamente com óleo essencial da planta (*in natura* e em sistema microemulsionado) sobre a corrosão microbiologicamente induzida em aço carbono AISI 1020.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *L. gracilis* Schauer;
- Avaliar a ação do óleo essencial *in natura* sobre biofilmes microbianos obtidos em sistema dinâmico;
- Produzir o sistema microemulsionado do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer e avaliar sua ação biocida sobre biofilmes microbianos obtidos em sistema dinâmico;
- Avaliar a ação *antibiofouling* e anticorrosiva do óleo essencial em sistema microemulsionado sobre aço carbono AISI 1020;
- Isolar, cultivar e identificar microrganismos endofíticos da folha e raiz de *L. gracilis* Schauer;
- Obter metabólitos secundários de microrganismos endofíticos cultiváveis de *L. gracilis* Schauer;
- Avaliar *in vitro* a atividade biocida dos metabólitos dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer sobre biofilmes microbianos;
- Avaliar a atividade *antibiofouling* e anticorrosiva dos metabólitos dos endofíticos de *L. gracilis* Schauer sobre aço carbono AISI 1020 a partir de técnicas eletroquímicas, gravimétricas e por micrografias eletrônicas de varredura (MEVs);
- Identificar quimicamente os metabólitos que demonstrarem potencial anticorrosivo sobre a CMI e bioatividade sobre biofilmes envolvidos nesse processo.

3. Metodologia Experimental

Para atender os objetivos propostos nesse trabalho a metodologia experimental adotada seguiu estratégias diferenciadas, compatíveis com as etapas de cada ensaio experimental, sendo resumidas no fluxograma abaixo (Figura 1). Os respectivos resultados são apresentados como artigos científicos propostos (submetidos e não submetidos).

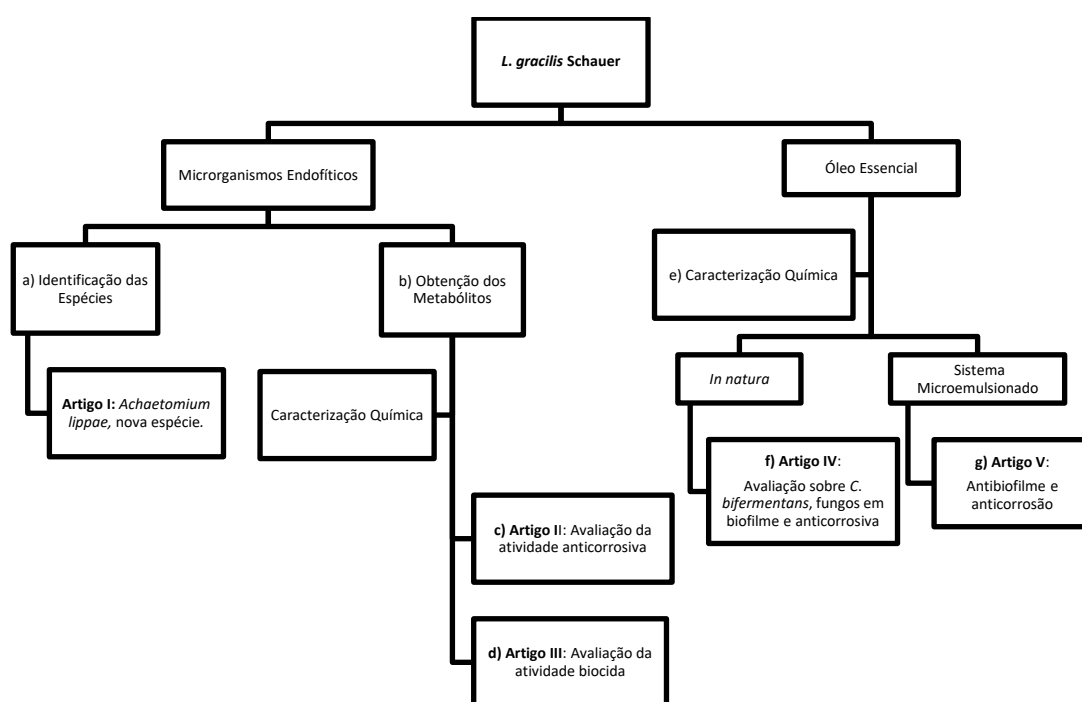


Figura 1: Fluxograma mostrando cada etapa experimental utilizada com os respectivos resultados gerados como proposta de artigos científicos.

Como forma de contextualizar e compreender a metodologia experimental adota no seu contexto geral cada etapa será brevemente descrita a seguir:

a) **Obtenção e identificação dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer**

Os microrganismos endofíticos foram isolados a partir da folha e raiz de *L. gracilis* Schauer, sendo cultivados em estufas microbiológicas. A identificação dos entofíticos foi realizada por duas estratégias metodológicas diferenciadas: para fungos realizada pelo sequenciamento genético da região ITS, LSU e *BenA* e para bactérias a partir do

sequenciamento da região ribossomal 16S. Após a identificação cada microrganismo foi preservado em coleção taxonômica microbiológica.

Como resultado dessa etapa uma nova espécie de microrganismo endofítico, isolado da folha de *L. gracilis* Schauer, foi identificada como *Achaetomium lippae*, sendo a proposta central do artigo I, derivado dessa etapa.

b) Obtenção dos metabólitos dos microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos isolados da folha e raiz de *L. gracilis* Schauer foram cultivados, isoladamente, em meios de culturas específicos mantidos em agitação em *shaker* por períodos e condições estabelecidos para cada tipo microbiano. A partir do caldo fermentado de cada microrganismo isolado foram obtidos os metabólitos após processos de filtração, centrifugação e liofilização, atendendo protocolos padrões. No total foram obtidos três metabólitos de três espécies microbianas diferentes.

c) Avaliação da atividade anticorrosiva dos metabólitos

Nesse ensaio foram utilizados cupons de aço carbono AISI 1020 de forma circular, com 2,5cm de raio, que foram previamente tratados, seguindo protocolo padrão de retirada de impurezas e produtos de corrosão. Os cupons foram utilizados para os ensaios eletroquímicos e gravimétricos na avaliação da atividade anticorrosiva.

Os ensaios eletroquímicos e gravimétricos foram subdivididos em: avaliação da atividade anticorrosiva dos metabólitos com diferentes concentrações, separadamente e em associação, sobre cupons contendo biofilmes microbianos e na ausência destes, também em diferentes concentrações e associados. Para a formação dos biofilmes foram utilizadas, separadamente, cepas bacterianas ATCC e bactérias totais (redutoras de sulfato, oxidantes de ferro e anaeróbias totais) provenientes de amostras de água da produção de petróleo. Os resultados dessa etapa estão apresentados na forma do artigo II.

d) Atividade biocida e *antibiofouling* dos metabólitos

Os metabólitos obtidos de todos os endofíticos foram avaliados separadamente sobre biofilmes para validar sua possível ação antimicrobiana. Os ensaios consistiram na avaliação sobre cepas bacterianas ATCC, fornecidas de forma liofilizada, e sobre microrganismos totais (bactérias redutoras de sulfato, oxidantes de ferro e anaeróbias totais) obtidos da água de produção de petróleo. Os ensaios foram realizados a partir da obtenção, em aparelho *shaker*,

de biofilmes sobre a superfície do aço carbono AISI 1020, sendo avaliada a ação dos metabólitos em diferentes tratamentos por diferentes períodos de contato. Os resultados foram obtidos pela relação espectrofotométrica, número mais provável de bactérias (NMP), *pour plate* e micrografias eletrônicas de varredura. A atividade *antibiofouling* consistiu nos tratamentos dos cupons de aço carbono AISI 1020 antes da formação dos biofilmes microbianos, como descrito anteriormente. Os resultados estão apresentados no artigo III, derivado dessa etapa.

e) Obtenção, caracterização química e formulação do sistema microemulsionado do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer

O óleo essencial foi obtido das folhas de *L. gracilis* Schauer a partir do processo de hidrodestilação. O rendimento foi calculado ao término da extração. A caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM), sendo utilizados padrões da biblioteca de massa.

O sistema microemulsionado foi produzido a partir do óleo essencial *in natura*, sendo obtidos todos os parâmetros reológicos para classificação adequada como microemulsão.

f) Avaliação da atividade biocida do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer *in natura* sobre *C. bifermentans* e biofilmes fúngicos e ensaios de corrosão

Após a caracterização química do óleo essencial realizou-se a avaliação da atividade biocida sobre *C. bifermentans*, que foi isolada a partir da água do produto de tanques de navios de petróleo e devidamente identificada por métodos biomoleculares. Os testes avaliando diferentes concentrações do óleo essencial *in natura* foram realizados por antibiograma.

Para os ensaios da atividade sobre biofilmes fúngicos foram utilizados biocupons retangulares de aço carbono AISI 1020, que foram dispostos em sistema dinâmico com circulação de água forçada para obtenção dos biofilmes. Posteriormente, os biofilmes obtidos foram submetidos a diferentes tratamentos do óleo essencial *in natura* por diferentes períodos de contato.

Com a retirada dos biofilmes da superfície dos biocupons procedeu-se os testes de corrosão da atividade do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer *in natura*. Os ensaios de corrosão subdividiram-se em eletroquímicos e gravimétricos, seguindo, para isto, a mesma metodologia adota nos ensaios da avaliação anticorrosiva dos metabólitos. Todos os

resultados dessa etapa constitui a proposta do artigo IV.

g) Avaliação da atividade biocida e anticorrosiva do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer em sistema microemulsionado

A atividade biocida deu-se pela quantificação de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, oxidantes de ferro, redutoras de sulfato e sobre fungos, presentes em biofilmes, antes e após os tratamentos com a microemulsão do óleo essencial. Os biofilmes foram obtidos também em sistema dinâmico. A quantificação por espectrofotometria do biofilme total também foi realizada antes e após o tratamento com a microemulsão. Micrografias eletrônicas também foram obtidas como critérios comprobatórios da atividade biocida. O artigo V, por fim, agrega esses resultados como proposta de publicação.

Dessa forma, as etapas supracitadas buscam atender aos objetivos elencados nesse trabalho e permitem uma melhor contextualização da estruturação dos resultados dessa tese apresentados na forma de artigos submetidos.

Fundamentação Teórica

4. Fundamentação Teórica

4.1. Biofilmes microbianos

Para compreender a expressiva complexidade da corrosão microbiologicamente induzida e elaborar estratégias de controle efetivas, independente dos métodos, é necessário conhecer, em princípio, a constituição e biologia do biofilme bem como toda sua dinâmica e os fatores que possam interferi-la, além dos processos eletroquímicos desencadeados ou suprimidos pela comunidade microbiana. Esse capítulo destina-se a definir e caracterizar de forma geral a comunidade microbiana na forma de biofilme, dando ênfase ao processo de formação da comunidade, os tipos microbianos, os processos genéticos e bioquímicos envolvidos na formação e proteção do biofilme, e a ação metabólica direta e indireta no processo corrosivo.

4.1.1. Definição de biofilme

Os microrganismos são indiscutivelmente formas extraordinárias de vida. A alta variabilidade genética aliada à diversidade metabólica repercute na grande capacidade adaptativa e os tornam ecologicamente diferenciados dos outros seres vivos. Uma forma especial de comunidade microbiana, já conceituada na Ecologia, denominada de biofilme é atualmente o foco das mais variadas pesquisas, principalmente na Biotecnologia. Esse destaque está nas mais variadas importâncias dos biofilmes nos diferentes setores: produção de vinagre e enzimas (Rosche *et al.*, 2009), possíveis vetores biotecnológicos (Kaplan *et al.*, 2004), biorremediadores ambientais (Wood *et al.*, 2011), estimuladores de crescimento de plantas (Davey & O'Toole, 2000), uso como biofábricas (Davey & O'toole, 2000) e até mesmo como inibidores de corrosão (Zuo, 2007), entre outras propriedades.

O termo biofilme foi empregado pela primeira vez nos anos 70 para caracterizar o desenvolvimento em associação apenas de bactérias, logo após ser reconhecida a possibilidade de microrganismos adsorverem e colonizarem superfícies (Benetton, 2007). Até então, não se tinha evidências que poderia haver a associação de outros tipos microbianos constituindo comunidades sésseis complexas, e muito menos a possibilidade de tipos e espécies de microrganismos diferentes interagirem tão especificamente constituindo um

mesmo nicho. Partindo das primeiras definições a partir dos anos 80 e fazendo uma interligação das principais definições existentes na literatura atual o conceito básico de biofilme pode assim ser compreendido:

*“Associação de células microbianas que colonizam superfícies biótica ou abiótica, ou interfaces, dependendo-se inteiramente do fluxo do meio, e que se mantem envolvida em uma matriz polimérica extracelular (EPS) altamente hidratada, rica em biomoléculas e que podem sofrer alterações genotípicas e fenotípicas desencadeadas por processos bioquímicos e genéticos, denominado **quorum-sensing**.”* (Consterton et al., 1999; Stewart, 2003; Singh et al., 2006; Flemming & Windenger, 2010; Gambino & Cappitelli, 2016).

É fato que há uma predileção evolutiva para que os microrganismos formem colônias e comunidades com sinalizações, bioquímicas ou genéticas, bastante complexas e que não estejam apenas isolados em colônias puras no ambiente. Estima-se que cerca de 90% de bactérias, por exemplo, estejam na forma de biofilme, o que garante maior taxa de sobrevivência, resistência a fatores estressantes (alteração de pH, escassez de nutrientes, ação de biocidas e toxinas, entre outros.), amplas chances de recombinação genética e colonização de novos ambientes, até mesmo os mais inóspitos. Seguramente, o desenvolvimento de biofilme mantido pela matriz polimérica extracelular, ou EPS, que representa 70 a 80% da sua composição na íntegra, é fator essencial para que todas as alterações genéticas e bioquímicas da comunidade se mantenham e ainda possibilite a resistência à ação dos mais variados tipos de biocidas e de ataques predatórios, dentro das relações ecológicas de cada ecossistema (Rinaudi & Giordano, 2010).

A Figura 2 apresenta uma micrografia ilustrando a presença de biofilme sob a superfície de aço carbono 1020 AISI mostrando a presença da matriz polimérica extracelular e algumas bactérias (Figura 2).

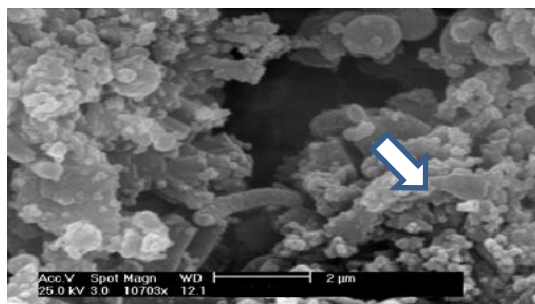


Figura 2: Micrografia de biofilme formado em biocupom de aço carbono 1020 AISI mostrando algumas células bacterianas e o EPS (indicado pela seta). Aumento de 10703x. (Viana, 2009).

Apesar do desenvolvimento de biofilme dar-se, na sua grande maioria, sobre algum tipo de superfície, seja ela abiótica ou biótica, existe uma teoria que afirma a formação e manutenção de biofilmes, sem necessariamente ocorrer sob uma superfície, sendo esses classificados como flocos ou grânulos microbianos, que entram igualmente na definição de biofilme (Xavier *et al.*, 2003). A modulação na forma de flocos ou grânulos não altera os processos bioquímicos e genéticos já existentes em qualquer tipo de biofilme em superfície, mas é considerada uma estratégia adaptativa diante dos fatores de interferência na formação da comunidade microbiana (Masic *et al.*, 2010).

O processo de formação do biofilme assumiria uma função sigmóide no tempo e no espaço (Consterton, 1999) e que pode ser didaticamente dividida em três diferentes etapas: ataque à superfície, crescimento e desprendimento (Ashhab *et al.*, 2017) (Figura 3). Inicialmente, há adesão e acumulação de células microbianas por determinada área de superfície em determinado tempo, essa fase é classificada como “ataque”. Correlacionando essa fase com o acúmulo de biomassa o tempo passa a ser considerado negativo (-t) na curva sigmóide, passando a ser positivo (+t) apenas quando existir acúmulo de células microbianas propriamente ditas. O que ocorre anteriormente a essa fase é apenas o acúmulo de matéria orgânica e não da quantidade de microrganismos, levando ao aumento da biomassa dentro de um tempo considerado negativo (-t). Outro fator relevante para considerar o tempo como negativo (-t) é que pode existir biomassa de origem orgânica acumulada sobre a superfície anteriormente à formação do biofilme propriamente dito. É bastante relevante para o ataque inicial (adesão) a presença de matéria orgânica (Nwodo *et al.*, 2012), porém as características da superfície podem proporcionar e facilitar, por si, a adesão e consequente formação do biofilme.

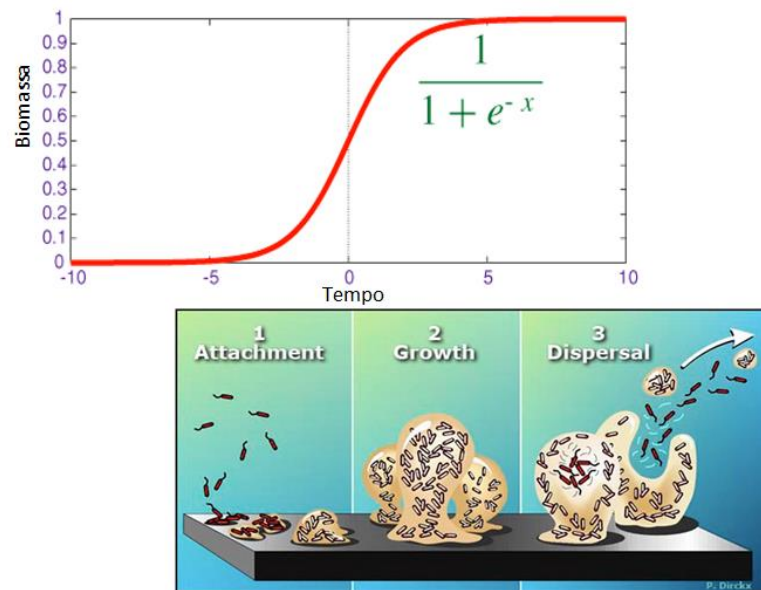


Figura 3: Formação do biofilme: correlação entre a função sigmóide e as etapas de formação de biofilme. Adaptado de Stoodley *et al.* (2003).

Na fase de crescimento da comunidade microbiana há proporcionalmente o aumento da biomassa em função do tempo, alcançando-se na etapa final a “estabilidade” na sua estruturação, o chamado “biofilme maduro” (Balsanelli *et al.*, 2014). Nessa fase vários tipos de sinalizações químicas, bioquímicas e genéticas ocorrem e são responsáveis por inúmeros processos essenciais para manter constante a biomassa e a integridade geral desse sistema biológico. Destaque para o processo de *quorum sensing*, responsável pela arquitetura da comunidade, pelos principais casos de resistência ao uso de biocidas e, também, pelo desprendimento de células, principal evento que define a última fase no desenvolvimento do biofilme (Kaplan, 2010). Esse processo merece destaque por ser correlacionado diretamente com o número de microrganismos dentro da comunidade, ou seja, a densidade do biofilme é a etapa inicial para desencadear vários processos genéticos e biomoleculares responsáveis por eventos cruciais, como produção de EPS em menor ou maior escala, grau de patogenicidade, no caso de espécies virulentas, e intensidade do processo corrosivo (Laspidou & Rittmann, 2004).

Vários fatores são considerados essenciais e que podem interferir diretamente na formação de biofilmes, no seu desenvolvimento e na sua modulação estrutural. Os mais relevantes são a hidrodinâmica do fluxo, a concentração de nutrientes e oxigênio, e a natureza e o tipo de superfície do material (Bajpai, 2015). O primeiro é apontado por influenciar o consumo do substrato (Masic *et al.*, 2010), a expressão gênica (Arenas *et al.*, 2016), as rotas

metabólicas (Simões *et al.*, 2007), a ecologia da comunidade microbiana (Battin *et al.*, 2016), a ação de biocidas (Abdallah *et al.*, 2014) e a organização estrutural do biofilme. A arquitetura do biofilme é inteiramente influenciada pela hidrodinâmica do fluxo, havendo uma organização estratégica para que o fluxo auxilie na manutenção da comunidade, não rompa o EPS, aumente seu tamanho através do transporte de partículas orgânicas e outros microrganismos, facilite o desprendimento de células microbianas e, ao mesmo tempo, permita o seu carreamento para colonização de novas áreas (Taherzadeh *et al.*, 2012). Com base nessa forte influência a arquitetura dos biofilmes é modulada de forma a haver canais e espaços (“clusters”) que permitam a passagem do fluxo, a distribuição de oxigênio e passagem de substâncias que possam ser nocivas (Stewart, 2003). O modelo estrutural (Figura 4) passou a ser considerado como padrão para definir o desenvolvimento da comunidade microbiana em biofilme. Esse considera que as bactérias aeróbias se distribuem superiormente no biofilme onde a concentração de oxigênio é maior e as anaeróbias se localizam mais internamente à comunidade, onde há baixa ou nenhuma concentração de oxigênio. O mesmo foi evidenciado a partir do momento em que as observações da ineficiência de alguns biocidas puderam ser comprovadas pelos avanços nos métodos de pesquisa, como a obtenção de micrografias de varredura e de força atômica (Beech *et al.*, 2002).

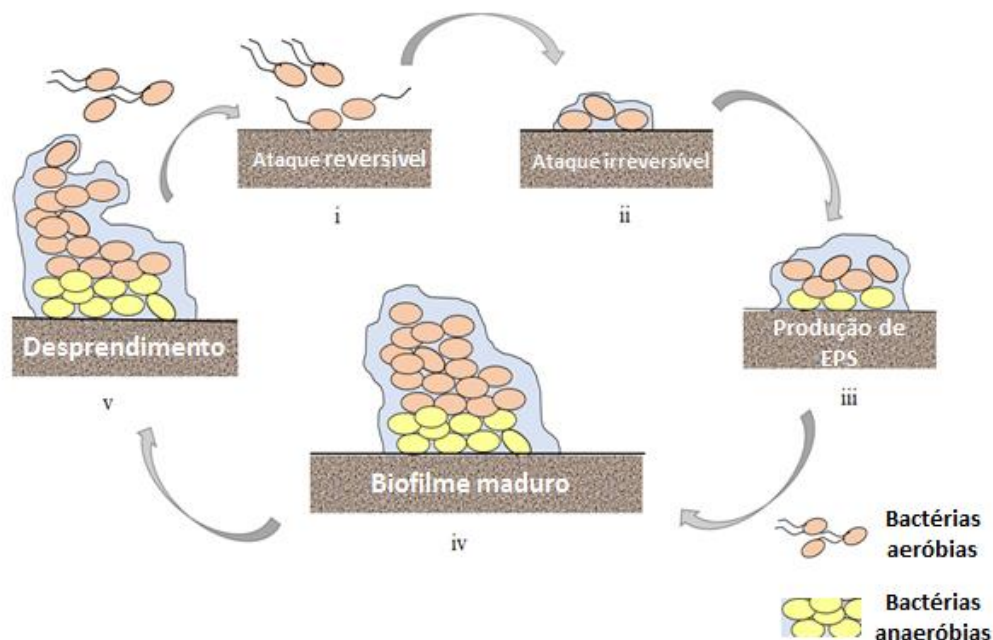


Figura 4: Etapas de formação de biofilme mostrando a prevalência de diferentes tipos microbianos de acordo com metabolismo da respiração. Adptado de Rendueles & Ghigo, 2012.

Destaca-se que a influência da hidrodinâmica do fluido interliga outro fator considerado relevante: a concentração de nutrientes e oxigênio, já que serve como carreador destes. A concentração de nutrientes, considerando principalmente partículas orgânicas, é essencial para a adesão inicial à superfície das células microbianas e desenvolvimento completo do biofilme. É necessário existir pelo menos algumas partículas orgânicas adsorvidas à superfície dos materiais para se iniciar a formação do biofilme, principalmente por bactérias, que são as pioneiras na formação do biofilme (Davey & O'toole, 2000). As partículas orgânicas acabam atuando de duas formas: servem como fonte energética primária, garantindo o crescimento e replicação dos organismos, e também como “âncoras” para sustentação e adesão à superfície, favorecendo a formação inicial da comunidade (Garrett *et al.*, 2008). Contudo, em superfícies em que o grau de matéria orgânica livre é bem inferior, nos casos de tubulações destinadas ao fluxo de águas tratadas, por exemplo, a formação de biofilme pode ocorrer e atingir grau de corrosão bastante significativo, porém o tempo de formação passa a ser lento, às vezes não atingindo a fase de maturação (Qian *et al.*, 2017).

A influência do oxigênio está intimamente associada ao tipo de metabolismo microbiano predominante dentro da comunidade e, assim, o oxigênio acaba “modulando” a configuração da arquitetura em relação aos tipos microbianos prevaletentes (Figura 4). Nessa configuração os microrganismos aeróbios são de certa forma forçados a se distribuírem ao longo de toda a periferia do biofilme onde a concentração de oxigênio tende a ser maior e assim manter seu metabolismo. Em relação aos anaeróbios o inverso ocorre, ou seja, a baixa oferta de oxigênio disponível no interior da comunidade propicia excelente ambiente para sua proliferação. Outro fator interessante é que a configuração arquitetada a partir da influência do oxigênio permite haver interações de metabólitos entre esses diferentes tipos microbianos, a partir da disponibilidade de subprodutos metabólicos (Burmolle *et al.*, 2014). Geralmente os microrganismos aeróbios além de deixar o ambiente amplamente favorável, pelo consumo do oxigênio presente, também dispõe aos anaeróbios subprodutos do seu metabolismo, como sulfatos, nitratos, óxidos, íons férrico, entre outros tantos que são fundamentais para seu metabolismo. Esse sinergismo é extremamente importante para compreender um pouco da complexidade da bioeletroquímica (tópico que será revisado à frente) da corrosão microbiológica podendo ser alvo para uso de métodos preventivos, que possam alterar essa configuração de distribuição microbiana, inibindo assim a proliferação microbiana em biofilme.

Considerando-se o aspecto da corrosão, a natureza dos materiais e o tipo de

superfície são fatores primordiais que limitam e influenciam a formação e estruturação do biofilme (Loosdrech *et al.*, 1995). Superfícies mais rugosas, de metais e polietileno, são apontadas por facilitar em maior escala a formação de biofilme, em curto período de tempo, influenciando a dimensão, o grau de deterioração (em materiais não metálicos) e a intensidade da corrosão, nos casos em que os microrganismos protagonizam esse processo (Apiláñez *et al.*, 1998). A facilitação à formação de biofilmes ocorre, principalmente, pela presença de espaços ou elevações, muitas vezes invisíveis a olho nu, na superfície dos materiais que possibilitam à adesão inicial dos microrganismos presentes no meio e que, posteriormente, iniciam a formação do biofilme pela produção excessiva de EPS. A Figura 5 mostra a formação inicial de biofilme facilitada pela rugosidade da superfície. Pela ausência de rugosidade na superfície há menor possibilidade de adesão de microrganismos, dificultando a formação de biofilme (Fig. 5 - esquerda). Na superfície com rugosidade a irregularidade da superfície propicia à adesão microbiana e, conseqüentemente, a formação de biofilme (Fig. 5 - direita).

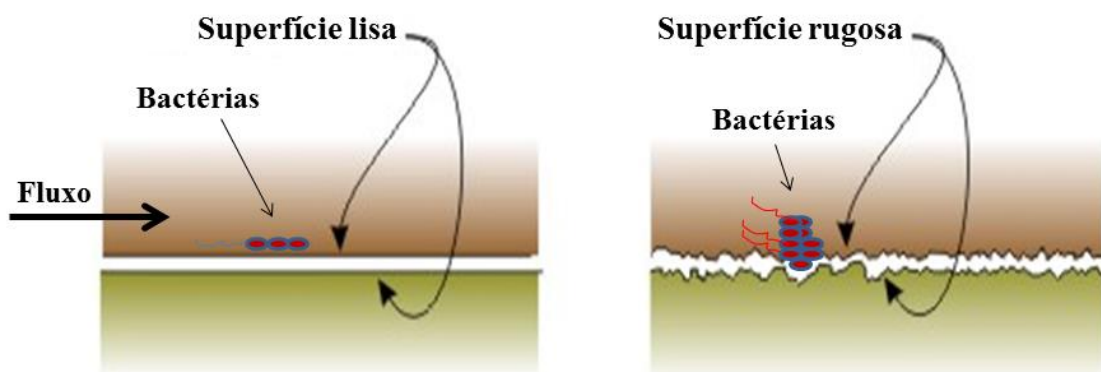


Figura 5: Influência do tipo de superfície na formação de biofilme. Adaptado de Levenson & Emmanuel, 2013.

Há também diferenças cruciais entre a própria superfície entre diferentes tipos de metal. O aço carbono, por exemplo, é mais propício a sofrer ataque microbiano, seja pela natureza e estruturação da superfície como também por sua composição química (Mansouri *et al.*, 2015). Contudo, é bastante usado nas indústrias pela relação custo benefício. Diferentemente, o aço inoxidável além de ser mais resistente à corrosão inorgânica é menos vulnerável à formação de biofilme em relação aos outros tipos de aço, sendo também resistente à deterioração por ação microbiana (Hyun *et al.*, 2014). Em contrapartida, o alto

preço limita o uso do aço inoxidável na grande maioria dos setores industriais, salvo quando realmente é indispensável a sua utilização.

Todos os fatores anteriormente mencionados, por influenciar diretamente a sua formação, a bioeletroquímica do processo corrosivo e a dimensão e intensidade deste, podem ser utilizados como princípios para a compreensão de como determinados produtos naturais poderão atuar na prevenção ou controle de biofilme.

4.2. Corrosão Microbiologicamente Influenciada (CMI) e bioeletroquímica

Por ser tão frequente a corrosão microbiológica acaba sendo erroneamente comparada ou seu conceito confundido com a corrosão propriamente dita – processo natural de desgaste dos materiais com participação ativa do meio, sem presença da atividade biológica (Gentil, 2011). A dubiedade corriqueiramente aplicada aos conceitos gera duas importantes implicações: uma delas está no fato de considerar que sempre haverá corrosão quando detectado a presença de microrganismos, sendo esses os únicos responsáveis nas mesmas modificações química dos materiais que ocorrem na corrosão sem participação de ordem biológica; e a outra está no inverso, em que todos os outros casos de corrosão, quando não detectada a presença microbiana, são de origem inorgânica, não levando a importância da possível participação direta ou indireta desses organismos. Considerando que os meios utilizados nos processos industriais não são totalmente estéreis, a ampla capacidade adaptativa dos microrganismos aos mais variados ambientes, a ocorrência natural do processo corrosivo e a ausência de métodos altamente precisos de acompanhamento de ambos os processos, torna-se difícil realmente distinguir os dois conceitos, bem como suas peculiaridades e até quando a corrosão é puramente microbiana ou não (Javaherdashti, 2016).

Diante da pertinente discussão que abrange o cenário científico e industrial, nessa questão, faz-se necessário compreender o porquê caracterizar a CMI como fenômeno diferenciado, de ação fortemente biológica, com reações bioquímicas ímpares, de eletroquímica complexa e que pode, ou não, se sobrepor à ação natural do processo corrosivo, obviamente também possuindo reações similares e cruciais que a enquadra dentro da grande categoria dos processos corrosivos.

Assim, a seguir, será apresentada de forma geral a bioeletroquímica da CMI de forma a contrapor (ou sobrepor) com a eletroquímica do processo corrosivo enfatizando a participação ativa dos microrganismos não apenas como agentes influenciadores, mas como

mediadores e protagonistas do processo de corrosão por agir direta ou indiretamente a partir da sua atividade metabólica, tornando o processo único e diferenciado.

4.2.1. Corrosão inorgânica e eletroquímica

A corrosão é um processo natural de reações químicas e eletroquímicas que resulta na transformação das propriedades dos materiais metálicos e não metálicos do estado mais nobre para o menos nobre, principalmente levando à forma de óxidos, estado de menor energia (Gentil, 1999). É também considerado um grande problema multifísico nos setores industriais (Segui, 2014). Ao longo do tempo o processo de corrosão era visto unicamente por ocorrer na presença do oxigênio, se restringindo a ambientes totalmente aeróbicos ou com a presença indireta do oxigênio. Contudo, outros grupos químicos podem servir como fortes agentes oxidantes, como o sulfato, nitratos, entre outros, sendo esse um dos pontos em que a CMI ganha destaque por possuir microrganismos com diferentes vias metabólicas potencialmente aliadas à corrosão de forma direta ou indireta (Batmanghelich *et al.*, 2017).

Por ocorrer com maior frequência em meio aquoso (cerca de 90%) o processo corrosivo passa a ser classificado como corrosão eletroquímica (Wolyneq, 2003), onde há fluxo contínuo de elétrons do ânodo (região de oxidação) para o cátodo (região de redução) através do metal. O fluxo de elétrons gera uma corrente em que há desgaste no ânodo e deslocamento para o cátodo, geralmente com o oxigênio comoceptor final ou hidrogênio (H₂), nos casos de ambiente anaeróbico. No decorrer dessas reações o meio tem papel crucial para o início e manutenção da corrosão. Meios considerados mais agressivos como solução salina, água de produção de petróleo e gás, bem como a própria água do mar aceleraram significativamente a corrosão (Liu *et al.*; 2014), o que dificulta a atividade dos inibidores, independente do tipo a ser usado.

A corrosão eletroquímica pode ser representada a partir de vários esquemas didáticos com o objetivo de simplificar o processo e, conseqüentemente, facilitar a compreensão. Esquemas usando ligas de ferro são corriqueiramente empregados para tais fins. Assim, para se aproximar da realidade das grandes indústrias e com os materiais nela empregados, será ilustrado o processo ocorrendo sob a superfície do aço carbono em contato com o meio aquoso e gerando a corrosão em forma de *pits* (Figura 6). Essa é a principal forma de corrosão eletroquímica localizada, também frequentemente provocada por microrganismos (Chen *et al.*, 2015).

Entre a superfície do aço carbono e o meio aquoso há formação de uma interfase, mantendo a estabilidade do material através da formação de um filme passivador que o protege da corrosão de forma natural, devido às próprias características do material e, principalmente, pela ausência de formação de célula de aeração diferencial, podendo ser avaliado através de técnicas de potencial de repassivação (E_r), que representa o potencial abaixo do qual não há processo corrosivo na forma de pite e que, acima desse, há corrosão pelo conseqüente rompimento do filme (Szkłarska-Smialowska, 1999). A formação do filme passivador pode ocorrer também pela ação de produtos naturais derivados de vegetais, como extratos e óleos essenciais ou não, inibindo a corrosão de forma efetiva e representando uma nova forma de controle economicamente viável e ambientalmente aceita (Rani & Basu, 2012).

A irregularidade sobre a interfase pode distribuir o oxigênio presente no meio em concentrações diferenciadas, gerando uma célula de aeração diferencial com formação de uma região pobre em oxigênio (anódica) e outra com maior concentração de oxigênio (catódica) sobre o filme passivador do material. A manutenção da separação entre a região anódica e catódica gera uma célula eletroquímica, onde os elétrons tendem a ser transferidos da região anódica, onde há dissolução do material (corrosão), para região catódica, considerada cumulativa desses elétrons.

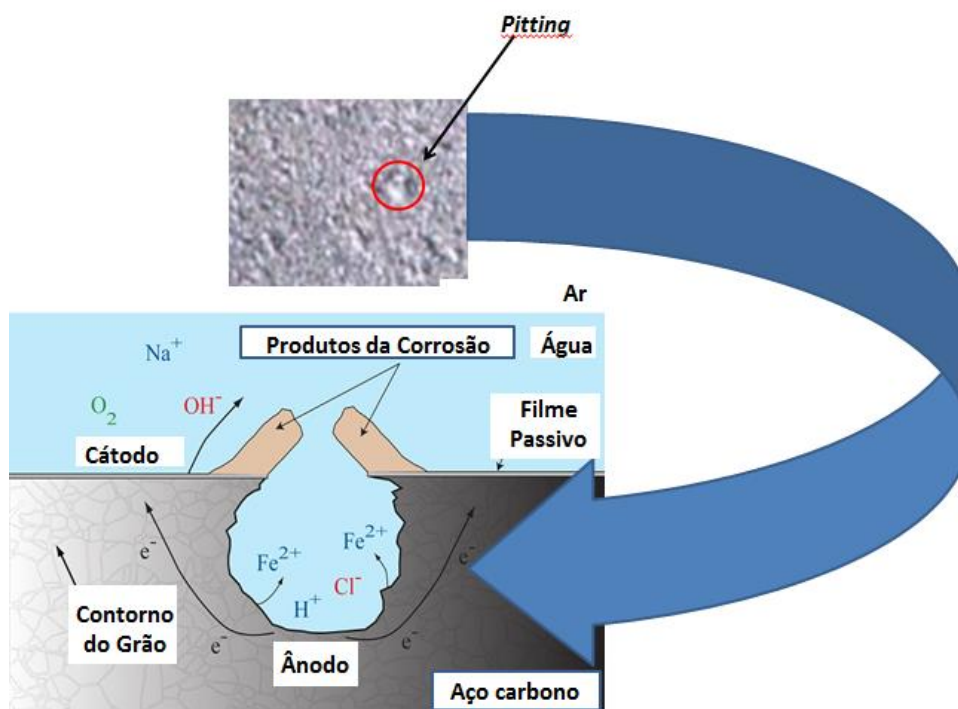
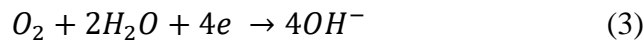


Figura 6: Corrosão eletroquímica: ilustração da formação de *pitting* a partir da dissolução do aço carbono em meio aquoso. Fonte: Adaptado de Segui (2014). Micrografia óptica da superfície de aço carbono 1020 AISI mostrando a presença de pites. **Fonte:** autoria própria.

A transferência dos elétrons da região anódica à catódica ocorre através do meio eletrolítico com velocidades equivalentes, com o oxigênio agindo como receptor (consumindo) e reduzindo, assim, o acúmulo de elétrons. Na região anódica há o desgaste direto do aço pelo carregamento dos eletrodos de elementos constituintes, como o ferro (Reação 1), liberando a forma oxidada (Fe^{2+}) que pode se combinar com outros elementos e formar subprodutos bastante corrosivos, como sulfetos, por exemplo. Também pode haver a redução de prótons (Reação 2) pela diminuição na concentração de oxigênio ao longo do tempo, sendo essa reação exclusiva de ambientes anaeróbicos e com forte participação de microrganismos como bactérias redutoras de sulfato (BRS) no caso da biocorrosão. Na região catódica a redução do oxigênio gera hidroxilas (Reação 3) que podem se combinar com outros elementos químicos, resultantes da corrosão do aço carbono e presentes no próprio meio, gerando os denominados produtos da corrosão, que na maioria das vezes se cristalizam e podem agravar ainda mais a corrosão. Contudo, os produtos da corrosão podem, em alguns casos, contribuir para o estado inerte do metal reduzindo a reação de dissolução e cessando a corrosão (Refait *et al.*, 2015).



Elementos como o cloro (Cl^{-}) e o sódio (Na^{+}), presentes na água do mar, são eletrólitos que favorecem amplamente a corrente, contribuindo para o rápido desgaste dos materiais e dificultando a inibição da corrosão por impedir a formação ou romper o filme protetor (de passivação) (Caliari *et al.*, 2014). Há uma correlação direta da gravidade da corrosão com a distância entre as regiões, ou seja, quanto maior a distância entre a região anódica da catódica maior será o grau de corrosão e, isso, também é válido quando se há um meio altamente favorável à manutenção da corrente.

De forma geral, a situação ilustrada exemplifica bem a corrosão ocorrendo de forma natural nos mais variados tipos de ambientes e que também pode ser comparado à ocorrência em tubulações de petróleo, onde é justificado pela utilização de água nos mais diferentes setores de produção, sendo usual e fundamental para a eficiência dos processos de exploração e extração. Por outro lado, o diferencial no esquema do processo de corrosão aqui mostrado é a ausência de formação de uma única célula de aeração diferencial, como é

habitualmente exemplificado através de uma única gota de água sobre o material. A célula de aeração diferencial, aqui ilustrada, acaba sendo formada por cada “grão” do aço, ou seja, as microdimensões de cada partícula de grão, com tamanho irregular, geram concentrações diferenciadas de oxigênio levando à amplificação do efeito de aeração diferencial e, conseqüentemente, acelerando o processo corrosivo, que passa ao longo de tempo de forma microscópica e aparentemente invisível a um grau severo e de maior proporção. Esse comportamento é bem analisado por simulação de corrosão localizada e modelação de pites (Murer & Buchheit, 2013).

4.2.2. Eletroquímica da CMI

A formação do biofilme microbiano sobre a superfície dos materiais nem sempre é fator crucial para desencadear a corrosão, principalmente quando se leva em consideração a possibilidade do próprio biofilme se estruturar como um filme protetor, evitando assim o desgaste dos materiais (Zuo, 2007). Entretanto, na maioria dos casos, o desenvolvimento do biofilme pode induzir ou acelerar a corrosão por formar também uma célula de aeração diferencial, de forma similar à inorgânica, mas com aspectos bem peculiares por se tratar da variedade biológica dos microrganismos aliado aos seus mecanismos de interação, espécie-especie, bem como com a superfície dos mais variados tipos de materiais, e de metabolismo celular (Saba *et al.*, 2017).

Para se efetivar o processo de biocorrosão propriamente dito há vários outros fatores agem que, direta ou indiretamente, são cruciais para a velocidade, o grau e o resultado final (ou não) do processo corrosivo. O principal é a formação e a estruturação do biofilme sobre a interfase dos materiais. O desenvolvimento da comunidade microbiana em determinado tempo, sobre uma área específica diante dos fatores de interferência ou favorecimento desse processo irão refletir diretamente no grau da corrosão, logicamente com dependência direta também do tipo de material (aço carbono, aço inoxidável, acrílico, entre outros). As interações bioquímica, genéticas e metabólicas dentro do biofilme constitui outro fator protagonista para o início, continuidade (ou não), extensão e tipo do processo corrosivo. Mecanismos complexos como o *quorum-sensing* são reconhecidos na resposta direta contra a ação de biocidas por agir alterando, acelerando e/ou modificando, as reações do processo corrosivo, que na maioria das vezes amplifica a corrosão (Garg *et al.*, 2014).

Diante de todos os fatores supracitados e considerando a relevância da modulação

do biofilme, a seguir, será abordada a generalidade da eletroquímica da biocorrosão incluindo os casos particulares de influência direta das bactérias oxidantes de ferro (BOF), produtoras de ácidos (BPA) e redutoras de sulfato (BRS), mas destaca-se que se tratando de microrganismos nenhum mecanismo envolvido na biocorrosão, de ação direta ou indireta, pode ser considerado estável ou imutável (Wade *et al.*, 2017).

4.2.2.1. Aspectos gerais

A eletroquímica da biocorrosão não existiria sem a presença clássica dos microrganismos na forma de biofilme. De forma mais adequada, o termo bioeletroquímica será empregado à biocorrosão como forma de diferenciar a eletroquímica da corrosão inorgânica, dando ênfase na particularidade da participação biológica, caracterizando-a como processo único e peculiar.

A formação do biofilme sobre uma superfície particular se dá a partir de três importantes fases, como relato anteriormente, porém didaticamente pode ser dividida em cinco: microrganismos livres, ataque, adesão, desenvolvimento, maturação e dispersão (Figura 7). A partir dessa subdivisão a bioeletroquímica passa a ser peculiar a cada etapa e tende a aumentar a complexidade no decorrer do processo, até atingir a fase de dispersão. A fase inicial de ataque é proporcionada por dois elementos fundamentais: presença de matéria orgânica sobre a superfície e grau de rugosidade da superfície (Busscher & Van Der Mei, 1997). Na fase de ataque as poucas células microbianas aderidas, principalmente bactérias, já podem favorecer bruscamente o início do processo de corrosão, mesmo sem haver a formação plena do biofilme.

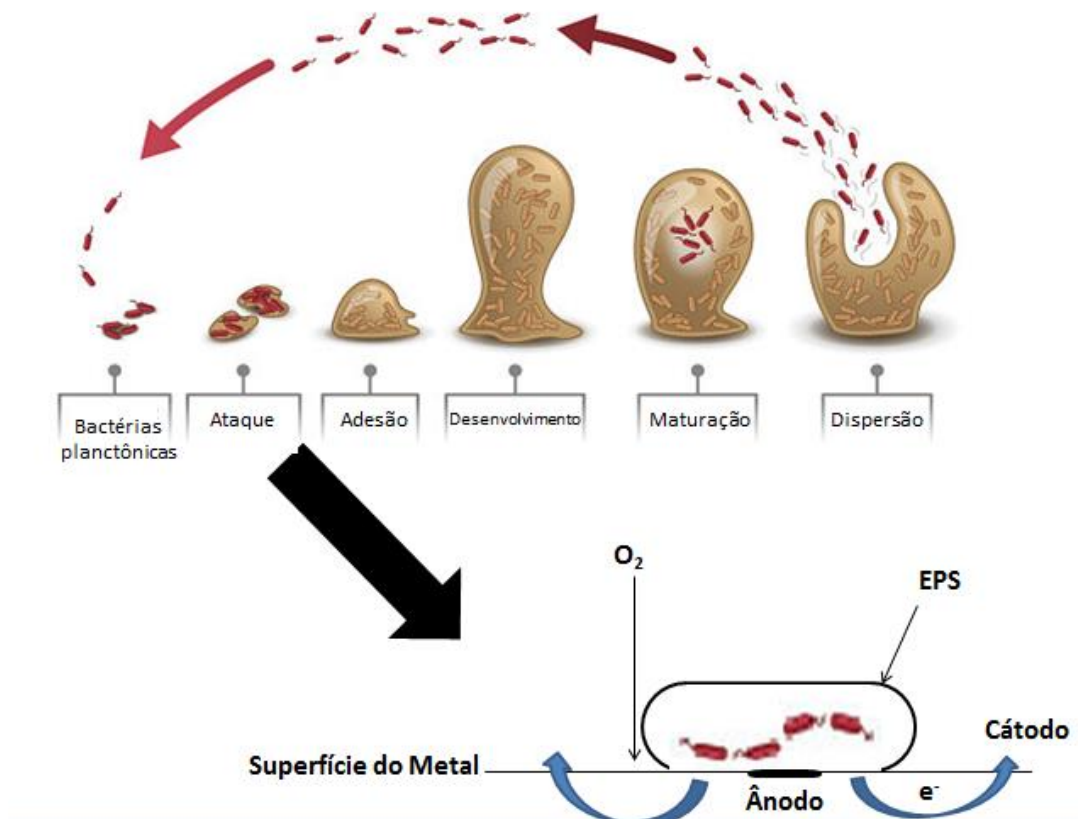


Figura 7: Processo de formação de biofilme e formação da célula de aeração diferencial. Adaptado de *Creative Commons Library*, apud de Sandle (2013).

O início do processo corrosivo nessa fase está fortemente associado à produção de substâncias extracelular polimérica (EPS), que apesar da pouca quantidade de microrganismos produzindo-a sua importância é significativa e indiscutível (Dong *et al.*, 2011). O evento “chave” de favorecimento ao início da corrosão como já relatado é a formação de uma célula com aeração diferencial (Figura 7), por se tratar também de corrosão eletroquímica. Na etapa de desenvolvimento, mesmo que seja aparentemente insignificante o acúmulo de células, pode haver formação de múltiplas pequenas células de aeração diferencial pela a produção de EPS, que gera concentrações diferenciadas de oxigênio. Assim, pode-se comparar ao mesmo processo que ocorre na corrosão inorgânica pela influência da estruturação irregular dos grãos no aço carbono (conforme ilustrado na Figura 6). Existe, da mesma forma, uma amplificação do efeito se for considerado que a formação do biofilme pode ocorrer de forma separada e não uniforme sobre a superfície (Chen & Chai, 2006). Certamente o grau de corrosão ainda não é substancial quando em comparação com o estado de biofilme já “maduro”, porém pode ser bastante significativo para o agravamento do processo corrosivo ao longo do tempo,

considerando a multiplicação do efeito, para isso basta imaginar múltiplas microcélulas de aeração diferencial geradas por biofilmes sobre a superfície de materiais ocasionando múltiplos pites, conforme ilustrado na Figura 8.

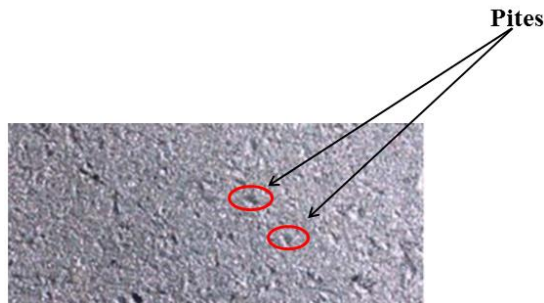


Figura 8: Ocorrência de pites na superfície de biocupom: micrografia óptica de biocupom de aço carbono 1020 AISI mostrando a presença de múltiplos pites gerados pelo processo de CMI. Aumento de 10x. **Fonte:** autoria própria.

Aliado à formação de célula de aeração diferencial, a manutenção dos produtos derivados do metabolismo microbiano presos pelo EPS contribuí significativamente para a agressão inicial ao metal (Chen *et al.*, 2015). De forma geral, os danos da corrosão já se iniciam desde o processo primário de desenvolvimento do biofilme, com a eletroquímica tornando-se da “clássica”, aplicável a todos os casos de corrosão, a particular, com reações apenas desencadeadas ou favorecidas pelos microrganismos.

Na etapa subsequente ao ataque o desenvolvimento do biofilme, intimamente associada a vários fatores, como velocidade do fluxo, concentração de nutrientes, número e tipos de microrganismos, entre outros, as reações eletroquímicas tendem a ser mais intensas e complexas como consequência direta da variedade estrutural da comunidade microbiana (Moradi *et al.*, 2016). Videla (2003) relaciona de forma simplificada a etapa de desenvolvimento do biofilme a partir da diferenciação metabólica pelo consumo ou não do oxigênio pelos microrganismos. Resumidamente, os microrganismos aeróbicos tendem a colonizar inicialmente a superfície dos materiais, multiplicar-se e consumir grande parte do oxigênio disponível, deixando o ambiente parcial ou totalmente ausente de oxigênio, o que torna favorável à proliferação das espécies anaeróbicas.

Caracterizando a bioeletroquímica, segundo o mesmo autor, o uso do oxigênio pela ação microbiana reflete o rápido desgaste do material na região anódica pelo consumo direto de elétrons, com oxigênio sendo o aceptor final. Nessa subetapa a corrosão é contínua. Porém, com o aumento da quantidade de microrganismos anaeróbicos e a mudança na

localização dos aeróbios dentro do biofilme, que passam a se localizar mais externamente, o processo corrosivo tende a se estabilizar ou até mesmo, em determinados casos, cessar momentaneamente devido às lentidões nas reações de consumo de hidrogênio (visto na reação 2) pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), ilustrado na Figura 9. Com o passar do tempo as reações de consumo de elétrons tendem, mesmo em ambientes anóxicos, a se reestabelecerem, passando a acelerar o desgaste do material agora devido a outros fatores como: ao fornecimento de elétrons dos elementos do material, por exemplo do ferro (visto na reação 1), para reações de redução do sulfato no caso das BRS quando não há outras ofertas de compostos carbônicos e, também, devido as combinações de alguns elementos com os subprodutos do metabolismo microbiano. Em se tratando de um ambiente como as águas de produção de petróleo as BRS podem participar na comunidade microbiana em biofilme, assim que a concentração de oxigênio se reduz, devido às altas concentrações de sulfato e compostos sulfatados, e por possuir metabolismo anaeróbico-aerotolerantes, tolerando a presença do oxigênio mesmo em pequenas concentrações, produzindo grande quantidade de EPS em biofilme (Wang *et al.*, 2014a). A estruturação da comunidade em biofilme pode assim ser demonstrada em relação à localização e, em termos de reações químicas, considerando apenas a presença de microrganismos aeróbios estritos e BRS, como microrganismos anaeróbios. A Figura 9 ilustra as reações envolvidas no desenvolvimento biofilme para as BRS.

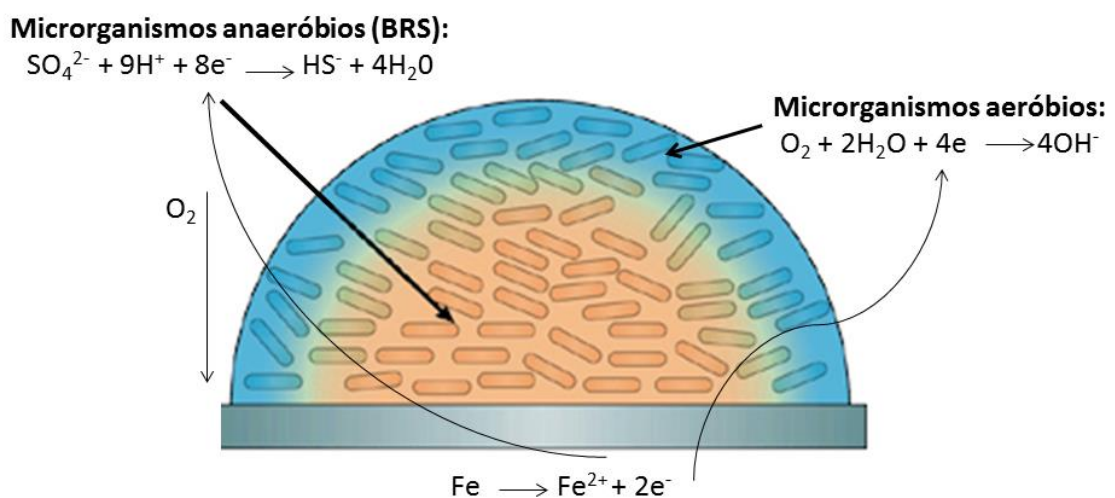
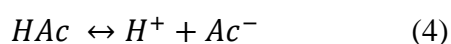


Figura 9: Etapa de desenvolvimento do biofilme considerando apenas a presença de dois tipos de microrganismos de acordo com seu metabolismo: microrganismos aeróbios, que utilizam o oxigênio com aceptor final de elétrons, e os anaeróbios, bactérias redutoras de sulfato (BRS). Adaptado de Franklin & Stewart (2008).

Há evidências que as BRS são as primeiras a colonizar o biofilme após a diminuição da concentração de oxigênio, proporcionando um ambiente também favorável a outras espécies microbianas, como as oxidantes de sulfato (BOS) e bactérias produtoras de ácidos (BPA) (Okabe *et al.*, 2000). As BRS, na etapa de desenvolvimento do biofilme, podem utilizar o ferro como fornecedor de elétrons para a redução do sulfato gerando subprodutos como Fe₂S, que pode intensificar a corrosão ou formar óxidos pela combinação com outros elementos, como os próprios subprodutos do metabolismo aeróbico, formando compostos como FeSOH e H₂SO₄ que se cristalizam na superfície do material. Segundo a Teoria de Despolarização Catódica (TDC) é comum o uso do ferro pelas BRS quando o biofilme sofre algum tipo de estresse, em que há escassez ou ausência de outros compostos orgânicos para redução do sulfato (Borenstein, 1994). Há entre as BRS e os microrganismos aeróbios um verdadeiro sinergismo nessa etapa, estabelecendo relações de cooperação através das “trocas” de metabólitos, o que mantém a integridade da estrutura do biofilme bem como a complexidade da bioeletroquímica. Apenas nesse exemplo as reações eletroquímicas permanecem favorecendo e induzindo a corrosão não de forma arbitrária, mas como algo essencial para a manutenção da biologia desses organismos (Liu *et al.*, 2017).

Em uma revisão mais atual, Gu (2014) caracteriza a etapa de desenvolvimento da comunidade microbiana em relação à bioeletroquímica de forma mais elaborada e complexa, destacando a importância das bactérias produtoras de ácidos (BPA) para o início da corrosão por *pites* e a gravidade do processo corrosivo através da produção de ácidos, principalmente ácido acético, pela fermentação. As BRS deixam de ser unicamente as pioneiras da biocorrosão em ambientes anaeróbios, principalmente devido a quantidade de sulfato ser constante ou insuficiente, ao ponto de não manter favoravelmente as reações eletroquímicas para a corrosão na forma de *pite*. Esse autor abre uma nova visão da biocorrosão, na etapa de desenvolvimento do biofilme: as BPA são consideradas por manter a intensidade da corrosão e fornecer a “matéria prima”, em termos de metabólitos, para a agressividade acentuada do processo corrosivo, dada através da dimensão e profundidade do *pite*. Assim a redução do ácido acético (HAc), de acordo com a reação 4, promove a oxidação do ferro de forma mais severa que a redução de prótons, comum no metabolismo das BRS, aumentando significativamente a corrosão em relação à atividade das BRS.



A Figura 10 ilustra a bioeletroquímica destacando a etapa de desenvolvimento, considerando a participação das BRS e das BPA, conforme sugerido por Gu (2014), juntamente com os microrganismos aeróbios.

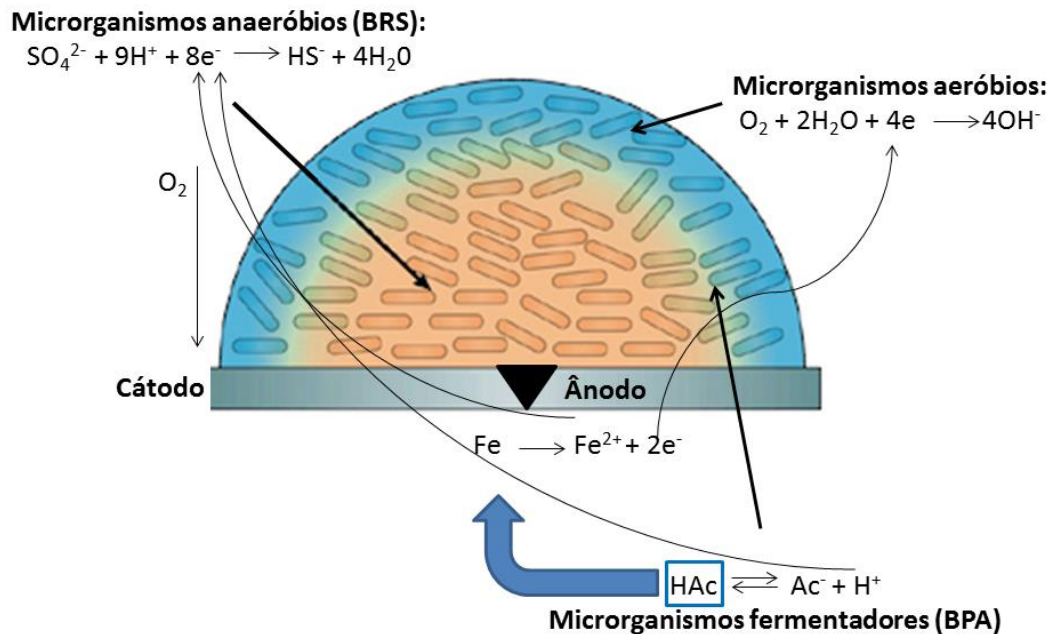


Figura 10: Etapa de desenvolvimento do biofilme destacando a presença das BPA: a produção de ácidos, como o HAc, pelas BPAs pode também auxiliar nas reações dos dois tipos de microrganismos já existentes. Adaptado de Franklin & Stewart (2008).

A presença das BPA é relevante e a produção de diferentes tipos de ácidos indubitavelmente afeta e agrava o processo corrosivo. A dissociação do ácido produzindo prótons (H^+) é flexível em relação à reversibilidade da reação e termodinamicamente favorável, oxidando mais rapidamente o ferro. Dessa forma, o pH no interior do biofilme passa a ser bastante influenciado por essa reação, chegando a diminuir drasticamente (em torno de $\text{pH} = 2,0$), o que agrava ainda mais a corrosão. Outro ponto importante é a possível combinação do próprio ácido (HAc) com o ferro oxidado (Fe^+), liberado na reação de desgaste do material, gerando outros subprodutos. A presença das BPA constituindo o biofilme por si só já se mostra, aqui demonstrado, preocupante do ponto de vista econômico para as grandes indústrias, principalmente de petróleo e gás, por serem indiscutivelmente protagonistas da biocorrosão.

Ocorrendo de forma isoladas as BPA já são protagonistas da biocorrosão, na forma

de consórcio com as BRS torna a biocorrosão simplesmente drástica em termos de grau e velocidade. Os prótons gerados na redução do ácido pelas BPA podem, na maioria das vezes, ser utilizados na redução do sulfato pelas BRS e outros produtos do metabolismo podem servir como fonte para as BRS quando não disponível o sulfato (Xu *et al.*, 2016). A própria localização das BPA no biofilme possibilita uma melhor interação dando suportes metabólicos para o decorrer das reações. Há dessa forma outro importante sinergismo dentro da comunidade microbiana categoricamente arquitetada. Porém, existe o lado negativo dessa arquitetura: as BRS poderão usufruir das fontes de sulfato até determinado ponto, pois a transferência de matéria pode limitar a oferta desse nutriente e interferir no processo corrosivo pelas BRS, o que acaba tornando-se “vantajoso” para a proliferação das BPA. A partir da prevalência das BPA há, como consequência direta, o aumento do grau de corrosão devido o acúmulo de ácidos e/ou prótons.

De forma resumida, a presença de ácidos, sulfato e prótons resultante da atividade metabólica desses microrganismos aumentam significativamente a taxa de corrosão quando comparados de forma isolada nessa etapa de desenvolvimento do biofilme (Gu, 2014), não havendo microrganismos mais ou menos importantes dentro do contexto da biocorrosão, já que todos são indiscutivelmente importantes. A etapa de desenvolvimento do biofilme é inteiramente influenciada por fatores como tipos de microrganismos planctônicos totais, presença de nutrientes e matéria orgânica, intensidade do fluxo, além da manutenção de determinados tipos de interações biológicas entre os microrganismos como, por exemplo, o *quorum sensing* (Dapa *et al.*, 2012). Todos esses fatores agem diretamente no grau e intensidade da corrosão, momentaneamente como também ao longo prazo, pois são cruciais no surgimento de adaptações intrínsecas ao desenvolvimento do biofilme (Zarasvand & Rai, 2014).

Nessa primeira parte, abordou-se a demonstração da bioeletroquímica do desenvolvimento do biofilme utilizando a ampla classificação biológica de acordo com o metabolismo microbiano em três grandes grupos: aeróbios, anaeróbios (BRS) e anaeróbios fermentativos (BPA). Nessa ampla classificação, há vários outros tipos de microrganismos pertencentes a cada grupo. As bactérias oxidantes de ferro (BOFe), por exemplo, são microrganismos aeróbios com grande destaque no processo de corrosão microbiológica, sendo os primeiros organismos identificados no processo e responsáveis na produção de depósitos densos de hidróxido de ferro a partir da oxidação do íon ferro a férrico (Usher *et al.*, 2014). Os depósitos de hidróxido de ferro formados pela combinação do íon férrico com água

(reação 5) são insolúveis e formam tubérculos de coloração castanha-avermelhada, que podem se depositar sobre as tubulações ou ser livremente carreados, favorecendo em ambos os casos a corrosão localizada por aeração diferencial.



Considerando a presença das BOFe, no contexto da bioeletroquímica da etapa de desenvolvimento do biofilme, a presença do íon férrico desencadeia reações importantes. A oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}), por exemplo, produz elétrons que podem ser utilizados por outros microrganismos aeróbios, localizados mais externamente no biofilme, ou ser fornecidos diretamente às BRS para a redução do sulfato. Com relação às BPA o sinergismo pode se dá pelo fornecimento de prótons para a redução de ácidos, ou pelo simples fato de favorecer o crescimento das BRS e outras espécies aeróbias. Além de contribuir nesse aspecto para intensificar a corrosão, a oxidação do ferro induz os íons cloretos a migrarem ao ânodo para neutralizar o acúmulo de carga, formando diferentes tipos de “cloretos de metal”, considerados altamente corrosivos (Ray *et al.*, 2010). A Figura 11 ilustra o sinergismo entre os outros tipos microbianos com a participação das BOFe, destacando-se as reações:

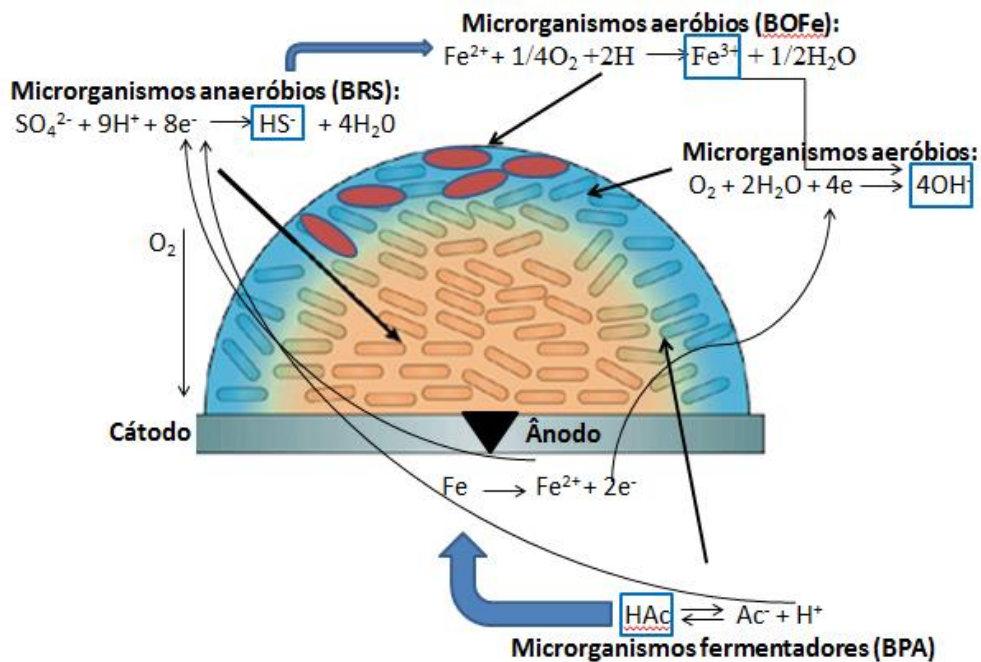


Figura 11: Etapa de desenvolvimento do biofilme destacando a presença das BOFe. Adaptado de Franklin & Stewart (2008).

As BOFe agem oxidando o ferro, e produzindo íons férricos que podem se combinar com as hidroxilas produzidas por outras espécies aeróbias ou se combinar diretamente com a água. Por possuir pouco fornecimento de energia ao seu metabolismo as BOFe têm que oxidar grande quantidade de ferro para poder atingir a fase *log*, o que demonstra crescimento lento dessas espécies (Emerson, 2012). O sulfeto produzido pelas BRS pode se combinar com o ferro antes da oxidação e produzir o sulfeto ferroso (FeS), podendo servir de base metabólica para outros tipos microbianos (Beam *et al.*, 2016). Com a grande produção de hidróxidos e/ou óxidos o ambiente interno do biofilme torna-se bastante ácido, favorecendo o crescimento das próprias oxidantes de ferro como também das BPA (Beech & Sunner, 2005).

Além disso, pode ocorrer a participação de microrganismos com outras vias metabólicas, no decorrer do desenvolvimento da comunidade em biofilme, como bactérias oxidantes de sulfato, redutoras e oxidantes de nitratos, além das metanogênicas (Dang & Lovell, 2016). Deve-se ressaltar que a grande maioria dos autores deixa de lado a importante participação dos fungos no processo corrosivo em sinergismo com as bactérias, justificando essa ausência, entre outros fatores, pela preferência de pH (alcalino para fungos), pela competição possivelmente existente e, considerando o ambiente de produção de petróleo e gás, o tipo de fluido, geralmente querosene (Rajala *et al.*, 2017). Porém, é fato que os fungos, isolados ou não formando biofilmes, são também aliados da corrosão.

Assim, somando-se todas as reações eletroquímicas que se iniciam na fase de desenvolvimento da comunidade microbiana, com a chegada de novas espécies com vias metabólicas diferenciadas, o resultado é o estabelecimento de interações estáveis a partir da fase de maturação do biofilme, também denominada de dispersão (Guilhen *et al.*, 2017). Os tipos de reações nessa fase, apesar de bem estabelecidos, estão sujeitos às modificações que são intimamente associadas a fatores externos e, principalmente, a fatores internos, desencadeados pela densidade da população dos microrganismos, denominado de *quorum sensing* (Hofer, 2016). Algumas espécies podem eventualmente acabar competindo com outras, chegando mesmo a eliminá-las da comunidade, porém nessa etapa de formação do biofilme as relações ecológicas também já estão bem fortalecidas, algo comum para a manutenção da vida através da adaptação (Ricklefs, 2011).

O termo *quorum sensing* (QS) refere-se à produção de substâncias extracelulares de baixa massa molecular que atuam como sinais químicos na ativação de determinados genes bacterianos em resposta direta à densidade populacional de microrganismos em biofilmes,

refletindo nas características genéticas responsáveis pela adesão, motilidade, divisão celular e maturidade, dentro da comunidade como um todo, nas suas sucessivas fases de desenvolvimento (Dobretsov *et al.*, 2006). A correlação do QS com a biocorrosão acaba sendo bastante complexa diante da especificidade de cada espécie microbiana, ou seja, cada espécie mesmo pertencente a um grande grupo como aeróbios ou anaeróbios (fermentadores ou não) produz uma sinalização química específica e própria. Por exemplo, as espécies do gênero *Serratia*, já relatadas por possuir envolvimento em casos de corrosão e biodegradação (Javaherdashti *et al.*, 2016), agem de forma diferenciada dentro de biofilme a partir de diferentes fatores, assim a alta densidade populacional (*quorum*) sinaliza para redução da tensão superficial, enquanto que a viscosidade do meio induz a expansão do crescimento celular (Moreira, 2014).

Dessa forma, se já existe muita especificidade em relação às mudanças fenotípicas, as alterações no metabolismo, e as reações a partir delas, são indiscutivelmente complexas. Por exemplo, é relatado que a despolarização catódica, e a conseqüente oxidação do ferro, por ação da bactéria *Shewanella oneidensis* em biofilme aumentou consideravelmente a partir da densidade das células bacterianas, mostrando a correlação da atividade corrosiva dessa espécie com o QS (Windt *et al.*, 2003). Substâncias reconhecidas no QS como *Lactonas de N-acilhomoserina* (LAHs) foram responsáveis em afetar a bioeletroquímica de alguns microrganismos aeróbios, como espécies de *Flavobacterium* sp e de BRS (Lv *et al.*, 2014). As reações eletroquímicas de bactérias redutoras de nitrato (BRN) e BOFe também sofrem alterações, na maioria das vezes cessam, quando analisadas a interferência de determinadas substâncias, quando aplicadas como forma de controle do crescimento microbiano em biofilme, pela inibição direta do mecanismo de QS (Kim *et al.*, 2015). Fica evidenciado, portanto, que a etapa de dispersão do biofilme é inteiramente dependente do mecanismo de QS, sendo a capacidade de dispersão das células microbianas como forma de colonizar novas áreas, o resultado dessa sinalização bioquímica, em que a ação dos fatores externos é quase nula.

4.2.3. Tipos de CMI

Diante da ampla dinâmica do processo de corrosão microbiológica é comum classificá-la em três tipos: I, II e III (Gu, 2012). O primeiro tipo foi estudado utilizando as BRS como microrganismo padrão, através do metabolismo do sulfato, sendo caracterizado

pela bioenergética das reações que beneficiam diretamente a comunidade microbiana em biofilme, ou seja, todas as reações fornecem energia direta para as atividades metabólicas dos microrganismos, resultando no desenvolvimento do biofilme (Gu, 2014).

O tipo II de CMI é o resultado da atividade dos produtos metabólicos resultantes do tipo I e do EPS. Segundo essa classificação, produtos como ácidos produzidos pelas BPA, sulfetos, óxidos, entre outros, contribuiriam fortemente no decorrer do processo de corrosão e o EPS atuaria como uma “barreira” física para conter a saída desses produtos, mantendo a aceleração da corrosão. Nesse caso, a energia necessária para manter a corrosão estaria apenas nos metabólitos (Ash, 2017). O terceiro tipo é definido como biodeterioração, que ocorre sem a participação necessariamente de biofilme e sem ação direta de reações eletroquímicas, principalmente pela ausência do meio condutor na maioria dos casos (Gu, 2014).

O maior problema nessa classificação está na dificuldade de definição dos tipos através de métodos específicos para prever até que ponto a biocorrosão seria apenas do tipo I sem prosseguir ao tipo II, tendo em vista a ampla dinâmica do biofilme. Segundo Beech *et al.*, (2005), a biocorrosão seria o resumo da interação da comunidade microbiana com o metal e com seus produtos metabólicos (bióticos) mais a ação dos produtos da corrosão (abiótico), como destacado na Figura 12.

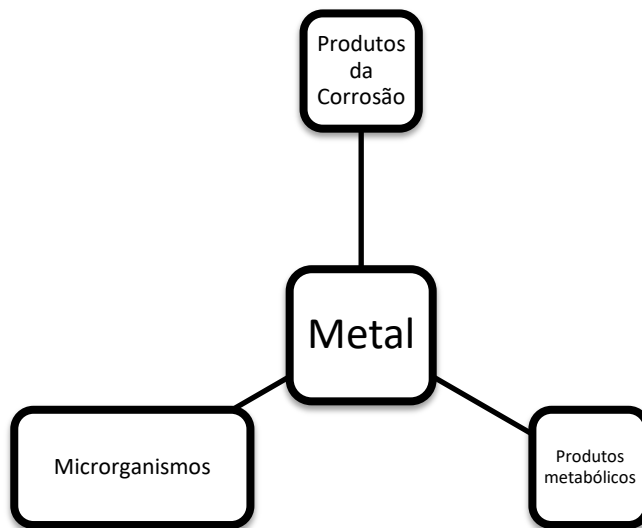


Figura 12: Diagrama representativo do processo de biocorrosão segundo Beech *et al.*, (2005).

Nesse diagrama, o início e desenvolvimento da corrosão microbiológica ocorrem não apenas como consequência direta da ação microbiana, mas também pela interação de dois outros fatores: a ação agressiva dos produtos gerados pelo metabolismo de todos os

microrganismos presentes em biofilme, como sulfetos, sulfatos, íons hidretos e férricos; e também pelos próprios produtos derivados das reações de desgaste do material (metal), que aceleram o processo de corrosão a partir da combinação de subprodutos que geram novos compostos com ação ainda mais corrosiva.

4.3. *Lippia gracilis* Schauer e suas propriedades

O gênero *Lippia* Linn (*Verbenaceae*) possui mais de 200 espécies de arbustos e árvores de pequeno porte com distribuição por todas as Américas e parte da África, com forte prevalência e diversidade no México e Brasil (Oliveira *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2011). A distribuição desse gênero no Brasil abrange os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, além de pequena parte dos estados do Ceará e Paraíba (Silva *et al.*, 2006a). Por apresentar características ambientais peculiares e, ao mesmo tempo, bastante similares em alguns aspectos ecológicos e naturais, a distribuição do gênero *Lippia* passou a se distribuir e prevalecer nos domínios dos biomas Cerrado e Caatinga, conforme ilustrado na Figura 13.



Figura 13: Domínios de distribuição do gênero *Lippia* no Brasil: prevalência exclusiva nos biomas Cerrado e Caatinga (Adaptado de Moraes *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Lippia* são caracterizadas por possuir folhas com dimensões variadas, com prevalência de tricomas glandulares, que secretam óleos essenciais de aroma agradável e com inúmeros princípios bioativos na sua composição, conferindo propriedades medicinais e terapêuticas bem elucidadas na literatura (Albuquerque *et al.*, 2006; Pereira *et*

al., 2013; Soares & Dias, 2013). Entre as inúmeras propriedades encontradas no óleo essencial das espécies desse gênero a atividade antimicrobiana merece destaque, pelos vários trabalhos publicados nesse aspecto (Pascual *et al.*, 2001; Pessoa *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2006, Bitu *et al.*, 2012). Substâncias como flavanóides, monoterpenos aromáticos (principalmente carvacrol e timol) e sesquiterpenos estão presentes no óleo essencial dessas espécies e são mencionadas por conferir a ação antimicrobiana bem como outras propriedades medicinais, como atividade laxante, cicatrizante, antiparasitária e, mais recentemente, anticâncer (Ferraz *et al.*, 2013).

A composição química dos óleos essenciais sofre efeitos de diferentes fatores ambientais e ecológicos em que a planta está submetida, influenciando diretamente suas propriedades, sejam potencializando-as ou diminuindo sua efetividade (Figueredo *et al.*, 2008). Nesse aspecto, é importante ressaltar que as espécies com prevalência na Caatinga são consideradas mais propícias para produzir moléculas biologicamente ativas como, por exemplo, com atividade antimicrobiana devido às condições edáficas e ambientais características desse bioma (Araújo *et al.*, 2007).

A *Lippia gracilis* Schauer é uma espécie tipo arbusto, caducifolia e com distribuição ampla na América Central e nos países tropicais da América do Sul (Lorenzi & Matos, 2002) (Figura 14). No Brasil é conhecida popularmente como “alecrim-da-chapada” ou “alecrim de tabuleiro”. A espécie, típica do Semiárido, abrange praticamente toda a região Nordeste do Brasil com incidência no bioma Caatinga (Mota-Neto *et al.*, 2010). Suas pequenas folhas, cuja fotografia é mostrada na Figura 14, são ricas em óleos essenciais utilizadas amplamente na medicina popular em forma de infusões, decocções ou macerados alcoólico para controle de vários tipos de processos inflamatórios, combate às doenças de pele, como micoses e urticárias, além de uso para vários tipos de dores e ulcerações (Pascual *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2012).

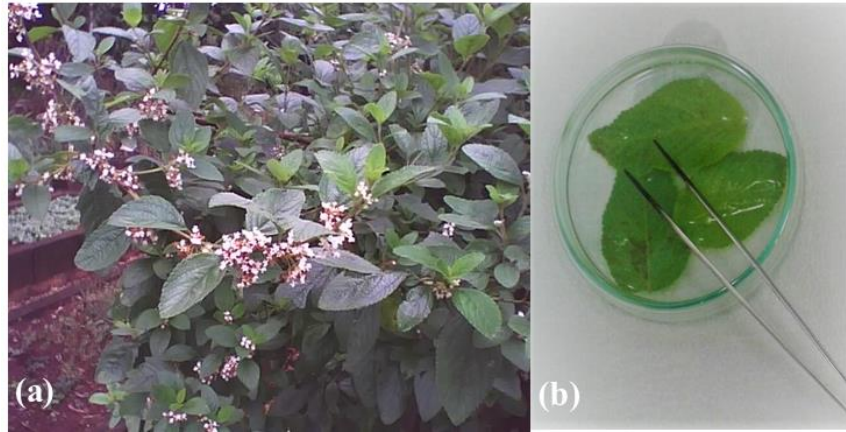


Figura 14: *Lippia gracilis* Schauer: (a) espécie em floração e (b) amostras de folhas retiradas para isolamento de microrganismos endofíticos (autoria própria).

As atividades anticonceptiva, antiinflamatória e antioxidante do seu óleo essencial já foram relatadas (Mendes *et al.*, 2010), assim como a cicatrizante (Riella *et al.*, 2012), além da potente atividade antimicrobiana, bastante discutida e avaliada na literatura sobre o controle de diferentes tipos de microrganismos, patogênicos ou não, como também em biofilmes (Bassole *et al.*, 2000; Viana, 2009).

A propriedade antimicrobiana é proporcionada principalmente por substâncias majoritárias como carvacrol, timol, p-cimeno, γ -terpineno, entre outros componentes, que são na sua grande maioria monoterpenos aromáticos (Marchese *et al.*, 2016). Esses componentes químicos podem ser isolados diretamente do óleo essencial, podendo atuar efetivamente para esse fim ou agir em sinergismo, a partir do uso do óleo essencial na forma pura, o que é mais comum por potencializar significativamente a atividade antimicrobiana (Yanishlieva *et al.*, 1999). Em ambos os casos *L. gracilis* Schauer passa a ser considerada fonte natural de biomoléculas potencialmente ativas, seja para atividade antimicrobiana ou para as demais propriedades já relatadas.

Por ser nativa da região Semiárida, ter boa distribuição geográfica dentro do bioma Caatinga, adaptando-se às variáveis climáticas e edáficas vigentes, como seca prolongada, solos salinos e altas temperaturas, além de ter excelente propagação vegetativa e possuir inúmeras propriedades químicas, medicinais e terapêuticas, *L. gracilis* Schauer é uma espécie bastante propícia a ser explorada, de forma sustentável, pelas populações da região Nordeste do Brasil, consistindo em uma nova base econômica rentável dentro de uma política cooperativa para indústrias farmacêuticas e química. Analisando seu potencial biocida torna-se ainda mais promissora para os setores industriais que sofrem danos pela corrosão

microbiológica.

4.4. Microrganismos endofíticos e potencialidades

A definição de microrganismos endofíticos é estabelecida a partir da relevância das relações ecológicas, geralmente neutras, entre os microrganismos e as plantas, seus hospedeiros. Melo & Azevedo (1998) definem, de forma geral, endófitos como sendo microrganismos, bactérias e/ou fungos, que habitam inter ou intracelularmente os tecidos das plantas sem causar sintomas ou danos aparentes durante todo o seu ciclo de vida. Para alguns autores esse conceito também se aplica a aqueles microrganismos que colonizam o interior de algas marinhas (Schoenrock *et al.*, 2014; Kwon, 2016). Porém, em determinado momento a neutralidade da relação, sempre enfatizada dentro das definições, pode deixar de existir e assumir outras relações ecológicas que vão deste o comensalismo até ao estabelecimento de uma relação desarmônica e parasitária, levando na maioria dos casos ao estado de doença (Siqueira *et al.*, 2011; Kumara *et al.*, 2013).

Apesar da relação de neutralidade ser sempre frisada pela maioria dos autores sabe-se que vários benefícios acabam sendo ofertados, direto ou indiretamente, dos endófitos ao seu hospedeiro. Tais como a produção de substâncias que promovem o crescimento da planta (Brader *et al.*, 2014), defesa contra patógenos, ou por induzir na planta a produção de substâncias bioativas (Azevedo *et al.*, 2000); além de mudanças na fisiologia da planta, em resposta ao ambiente, perante a interferência dos fatores externos, estressantes ou não (Redman *et al.*, 2002) que são bons exemplos da relação mutualista que pode se estabelecer pela presença desses microrganismos.

O início da interação endófito *versus* planta ainda é bem questionada, mas se sabe que a presença da microbiota da rizosfera é indispensável para as primeiras colonizações ainda na semente (Cocking, 2003). Há antes da germinação processos químicos de sinalização desencadeados entre os microrganismos da rizosfera e a semente objetivando a quebra da dormência e a possibilidade de colonização primária (Compant *et al.*, 2010). Alguns autores afirmam que a presença de endófitos na semente pode ser ainda mais precoce. A planta pode repassar alguns dos seus próprios endófitos durante a fecundação para a semente, ou seja, já internamente à semente há presença de endófitos que irão colonizar a futura planta (Compant *et al.*, 2011). É tão provável essa hipótese que há evidências de auxílio à germinação e enraizamento por parte de microrganismos já internos à semente em estudos onde não havia

rizosfera, utilizando solo esterilizado (Sikes *et al.*, 2016). Nas outras fases de desenvolvimento da planta os microrganismos endofíticos utilizam outras “portas” de entrada para penetrar e colonizar os diferentes tecidos vegetais. A partir do crescimento do sistema radicular fissuras podem surgir e possibilitar a entrada de microrganismos da própria rizosfera ou epífitos (Murphy *et al.*, 2015). Da mesma forma, outras estruturas podem fornecer acesso, como os estômatos e haustórios, bem como caules fragmentados ou quebrados, e flores durante toda a permanência do vegetal no ambiente (Saikkonen *et al.*, 2004). É conhecido que desde a fecundação da semente, passando por todos os estágios de desenvolvimento da espécie vegetal, e chegando até o fim da vida, as relações entre endófitos e plantas se mantêm e tendem a se tornar mais complexas, ao ponto de favorecer certas adaptações no decorrer de toda a evolução biológica, havendo mudanças apenas das espécies de endofíticos em questão, que são compatíveis com cada fase de vida do hospedeiro (Hardoim *et al.*, 2015). Acredita-se que todas as espécies de plantas possuam endófitos, fato justificado pela interação ecológica bem estabelecida como fruto da evolução conquistada ao longo de milhões de anos (Aguilar-Trigueros & Rillig, 2016).

Por se manterem permanentes durante todo o ciclo de vida da planta, e pela sua diversidade, os endófitos são fontes inesgotáveis, de certa forma, de novas potencialidades para diferentes setores. Desde a clara definição do conceito adotado por Bary (1866) o uso de endófitos para fins terapêuticos passou a ser conhecido, divulgado e mais explorado. O uso de antibióticos e de novas drogas a partir da prospecção desses microrganismos data-se desde o século XIX, sendo, ainda, algo bastante promissor diante de novas doenças, epidemias, doenças degenerativas e aumento dos casos de câncer (Centeno-Leija *et al.*, 2016 Moloney, 2016). A descoberta do metabólito taxol obtido do fungo *Taxomyces andreamae* como droga antitumoral possibilitou o aumento na estimativa de vida para pacientes com tipos diferentes de câncer e até mesmo a eliminação de tumores considerados bastantes agressivos, como de estômago, de fígado e pâncreas, além de tipos de leucemia (Gallego *et al.*, 2017). Para doenças degenerativas como Alzheimer a conquista de novas opções de tratamento torna-se urgente e a aquisição de biomoléculas derivadas de endofíticos já se tornou uma realidade (Li *et al.*, 2016).

O uso direto ou indireto, através da prospecção de genes, de substâncias metabólicas obtidas de endofíticos com propriedades antibióticas constituirão um novo *pool* de drogas para um problema frequente em unidades de tratamento intensivo e setores de diálises: as infecções por bactérias multirresistentes, que geram infecções hospitalares

secundárias e oportunistas em pacientes já debilitados, representando maior tempo de permanência nas unidades e cerca de 30 a 35% dos óbitos nesses setores (WHO, 2010). Substâncias novas, identificadas e derivadas do metabolismo de fungos endofíticos, demonstraram-se bastante eficientes na inibição das principais bactérias multirresistentes (He *et al.*, 2016) bem como àquelas derivadas de bactérias endofíticas (Doley & Jha, 2015). A tendência é que até 2020 cerca de mais de 100 substâncias estejam disponíveis no mercado como novos antibióticos com espectro de ação mais amplo e eficaz, principalmente contra as bactérias multiressistentes, além de substâncias que também funcionem como imunomoduladores em ação combinada à antibiótica (Mouli *et al.*, 2016).

Adicionalmente à importância da obtenção de novas drogas, os endófitos apresentam outras potencialidades, algumas já bem consolidadas no mercado. Outras são perspectivas bastante promissoras para diferentes setores. Na agricultura e pecuária novas potencialidades surgem a partir da prospecção e isolamento de microrganismos endofíticos com aplicação direta no campo, da obtenção de biomoléculas derivadas do metabolismo desses tipos microbianos ou pelas técnicas de engenharia genética de modificações dessas espécies, todas com objetivos peculiares a cada problema dentro desses dois grandes setores (Cocq *et al.*, 2016). A prospecção e triagem com intuito de obter endófitos como fonte de controle de pragas de diversas culturas através do controle biológico já constitui algo não tão novo (Copping & Menn, 2000; Couillerot *et al.*, 2013). Espécies como *Trichoderma hamatum*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. e *Paecilomyces lilacinus* mostraram-se eficiente no controle de *Drechslera tritici-repentis*, patógeno que causa a mancha do trigo (Larran *et al.*, 2016). Outros endófitos que habitam espécies de plantas de biomas com fatores ambientais bem característicos, e únicos no mundo, como a Caatinga, foram eficazes no controle de pragas de culturas tropicais *in vitro* e *in vivo* (De Souza *et al.*, 2016). Além da ação direta no controle de pragas há algumas espécies de endófitos que disponibiliza substâncias químicas à planta, classificadas como promotoras do crescimento celular, possibilitando o crescimento primário e secundário de forma rápida (Herrera *et al.*, 2016) ao mesmo tempo que a protege de patógenos. O que limita, ainda, o uso dessa potencialidade dentro da agricultura são os riscos de desequilíbrio ambiental, decorrentes da ruptura de interações biológica com a introdução de uma espécie exógena no ecossistema nativo e/ou circunvizinhos (Begon *et al.*, 2007) além do emprego de uma política de manejo sustentável eficiente, o que só será realmente efetivo com análises mais apuradas desses possíveis impactos.

Ainda no contexto de combate a patógenos e pragas, o uso de substâncias de

endófitos no controle de patologias veterinárias também é algo inovador. O agente etiológico da leishmaniose visceral do Velho Mundo, o protozoário *Leishmania donovani*, foi inibido *in vitro* por substâncias obtidas dos fungos endofítico *Fusarium* sp. e *Aspergillus terreus*, isolados das espécies *Mentha longifolia* e *Carthamus lanatus* (*Asteraceae*), respectivamente (Elkhayat *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016). No contexto das parasitoses, de grande impacto na saúde humana, a malária é uma das infecções que ainda possui elevado índice de mortalidade, principalmente em países tropicais como África, Índia e Brasil, e possui forte resistência às drogas já usuais como tratamento (Mwangoka *et al.*, 2013). Waterman *et al.* (2014) avaliaram extratos crus e purificados (ativos) de endófitos isolados de mangues com o intuito de obter atividade antiparasitária sobre *Plasmodium falciparum*, obtendo novas moléculas com atividade efetiva, mas limitada, na sua maioria, pela alta taxa de toxicidade apresentada. Porém, a eficiência da atividade de metabólitos de endófitos foi comprovada em estudo anterior (Castillo *et al.*, 2003) e ganha espaço para a produção de drogas mais potentes, dentro dessa problemática do controle e erradicação da malária.

Microrganismos endofíticos obtidos de espécies nativas de manguezais como *Avicennia germinans* L., além das propriedades sobre parasitoses, possuem potencialidades para reflorestamento desses próprios ecossistemas e de outros considerados tão ameaçados principalmente por perturbações antrópicas (Kumar Das *et al.*, 2016). Diante da relação mútua de favorecimento do crescimento vegetal, principalmente a partir de substâncias que conferem resistência ao estresse e servem como co-fatores enzimáticos (Oteino *et al.*, 2015) em “troca” do abrigo ofertado pelo hospedeiro, os endófitos podem ser extremamente eficientes em promover o reflorestamento de diferentes ecossistemas, principalmente aqueles que possuem capacidade de resiliência tardia e espécies vegetais que têm desenvolvimento lento (Hardoim *et al.*, 2015). Podem também proporcionar o crescimento rápido de culturas com biomassa de ampla importância energética (Wang *et al.*, 2016). Nesse contexto, os ecossistemas áridos e semiáridos são amplamente afetados por fatores ambientais severos, como a baixa disponibilidade de água, altas temperaturas, solos com quantidade de sal excessiva e pouca cobertura vegetal. Grandes áreas desses ecossistemas, em todo mundo, se encontram em processo de desertificação intenso ou severo (Bartuska, 2015), como, por exemplo, o bioma Caatinga (Costa *et al.*, 2009) e microrganismos endofíticos nativos são promissores do ponto de vista biotecnológico no reflorestamento dessas áreas (Soussi *et al.*, 2016) bem como os microrganismos presentes na rizosfera.

4.5. Gênero *Achaetomium* (*Chaetomiaceae*)

O gênero *Achaetomium*, da família *Chaetomiaceae*, inclui apenas quatro espécies de fungos filamentosos: *Achaetomium globosum*, *A. luteum*, *A. strumarium* e *A. umbonatum*, sendo por esse motivo e por ter aspectos morfológicos bastantes similares ao gênero *Chaetomium* que alguns autores não o consideram como um gênero propriamente formado (Rodríguez *et al.*, 2004). Os representantes dessa família estão presentes no solo, ar, e, principalmente, em substratos celulósicos. São, na sua maioria, saprófitos de vegetais e de matéria orgânica em geral (Umikalsom *et al.*, 1998) e têm ótimo desenvolvimento em ambientes com altas temperaturas, como regiões áridas e semiáridas, e de elevada pressão osmótica (Wang *et al.*, 2016). Algumas poucas espécies podem ser patogênicas em humanos imunossuprimidos (Guarro *et al.*, 1995). Entretanto, a grande maioria, pode ser endófito (Panozzo *et al.*, 2013) por estar intimamente associado à raiz na rizosfera (Wang *et al.*, 2016), auxiliando no desenvolvimento do vegetal e o protegendo de diferentes tipos de pragas (Moya *et al.*, 2016).

Metabólitos de endófitos dos gêneros *Achaetomium* e *Chaetomium* ganham destaque dentro da Biotecnologia (Soni & Soni, 2010) e em outras áreas por possuir diferentes propriedades como antitumorais, antimalarial, efeito citotóxico, ação enzimática (Fatima *et al.*, 2016), além de anti-reumatóide (Abdel-Azeem *et al.*, 2016). Especificamente de espécies de *Achaetomium* a atividade enzimática de xilanases representa excelente alternativa para uso industrial (Zhao *et al.*, 2013). Substâncias de diferentes classes químicas, como achaetomisinas, xantonases e antraquinonas, também são comumente produzidas por esse gênero, podendo demonstrar forte ação biocida (Selim *et al.*, 2014).

Dessa forma o uso de metabólitos derivados de espécies endofíticas do gênero *Achaetomium* apresenta-se como uma possível alternativa no controle de microrganismos em biofilmes envolvidos no processo de CMI, apesar de ainda não haver estudos sobre tal atividade.

4.6. Produtos naturais no controle da CMI

A ideia de utilizar produtos naturais, com intuito de prevenir e controlar a corrosão, surgiu a partir de critérios implementados por órgãos ambientais dentro da política de prevenção e mitigação de impactos ambientais gerados pelos grandes setores industriais no

mundo todo (Little *et al.*, 2007). A escolha de inibidores de corrosão tornou-se criteriosa no ponto de vista ambiental por necessitar atender três importantes pontos: não apresentar toxicidade, ou que esta seja relativamente baixa, ser biodegradável ou facilmente degradável, e, por fim, não bioacumular (Palou *et al.*, 2014), aliado ainda à perspectiva de mercado, atendidas pela sua efetividade e viabilidade econômica (Abdolahi *et al.*, 2014). Contraditoriamente, as ideias e os projetos de formulações e a avaliação desses inibidores, ambientalmente corretos, não partiram do meio industrial, e sim das instituições de pesquisa e ensino, como as universidades e institutos, como “oferta pronta” para os grandes setores industriais, como, por exemplo, o de petróleo e gás, que fomenta atualmente projetos de grandes impactos nessa área em todo o mundo (Javaherdashti, 2000).

No decorrer da história do uso de inibidores “amigáveis” da corrosão inorgânica a veiculação dessas substâncias para controle, em específico da CMI, iniciou-se em paralelo aos estudos desse tipo de processo corrosivo provocado (ou influenciado) por microrganismos em biofilme (Videla, 2002). Os primeiros bioprodutos foram inicialmente testados a partir da década de 70 (Cloete *et al.*, 1998), com proposta inicial de aturem juntamente com os biocidas sintéticos, mas nunca de substituí-los, o que ainda é hoje o grande entrave da produção de bioprodutos para o mercado: a disputa entra os sintéticos *versus* os naturais.

Vários tipos de bioprodutos são constantemente avaliados para controle da corrosão inorgânica (Raja & Sethuraman, 2008; Finsgar & Jackson, 2014) como também microbiológica (Gu, 2003; Chambers *et al.*, 2014). Entretanto, o arsenal de substâncias naturais, tomando como exemplo aquelas derivadas de plantas, atualmente usadas na indústria ainda é ínfimo comparado às sintéticas, embora o valor dessas ainda sejam substancialmente superiores. Esse fato pode ser justificado analisando-se dois importantes aspectos: a disputa econômica liderada pela indústria de produtos químicos e o tempo necessário desde a formulação do bioproduto até sua disponibilidade no mercado. Tomando como exemplo o Brasil, não há nenhum dado substancial e específico que consolide a utilização de bioprodutos totalmente natural como forma de biocida para controle da corrosão por uma companhia do porte da Empresa Brasileira de Petróleo e Gás – PETROBRAS. De forma geral, as políticas para uso de bioprodutos destinado ao setor industrial apesar do seu crescimento, principalmente defendido pelas instituições de ensino e pesquisa, ainda necessita de maiores investimentos, novas tecnologias e a criação de empresas exclusivas para formulação e produção, abrindo caminho para a consolidação, do que pode se tornar, um novo empreendimento promissor (Zhao & Wang, 2015).

Ao se considerar a eficiência dos bioprodutos sob o controle da corrosão, seja ela inorgânica ou microbiológica, observa-se que é perfeitamente equiparada ou até mesmo superior à ação dos sintéticos, e quando se refere à disponibilidade e a facilidade de obtenção são praticamente ilimitados (Ashraf *et al.*, 2013). Considerando como principais bioprodutos óleos essenciais e metabólitos de microrganismos endofíticos a gama de espécies potencialmente produtora, e as inúmeras moléculas bioativas que podem ser encontradas a partir destes para o controle da corrosão microbiológica podem se constituir um novo “arsenal” de biocidas indiscutivelmente infinito e ainda pouco explorado (Silva & Rodrigues, 2014).

4.6.1. Metabólitos de microrganismos endofíticos: potencialidades para o controle da CMI

Metabólitos secundários são compostos químicos biossintetizados em pouca quantidade, a partir do metabolismo primário dos organismos, e que não apresentam aparentemente funções essenciais correlacionadas ao seu desenvolvimento e crescimento (Bourgaud, 2001). Entretanto, a síntese dessas substâncias, especificamente por microrganismos endofíticos, tem papel essencial de defesa, nas sinalizações químicas interespecíficas com o hospedeiro e podem proporcionar defesa à própria planta contra parasitas e patógenos, além de induzir o crescimento primário e secundário do vegetal como também auxiliar no seu desenvolvimento e processos reprodutivos (Wink, 2010).

Diferentes tipos de classes químicas de metabólitos secundários podem ser produzidos por endófitos, na grande maioria com potencialidades biológicas com variados fins: terapêuticos, medicinais, fitopatológicos, agroindustriais, alimentícios, entre outros (Sudha *et al.*, 2016). Os antibióticos, produzidos principalmente pelo gênero *Streptomyces*, são as biomoléculas mais bem conhecidas, difundidas e de grande impacto social devido seu amplo espectro antimicrobiano (Watve *et al.*, 2001). Agentes antitumorais, como o taxol, por exemplo, são metabólitos obtidos de endófitos considerados um marco na história da medicina diante do impacto dessas substâncias na sobrevivência de pacientes e pela possibilidade de cura dos mais variados tipos de câncer (Expósito *et al.*, 2009).

Assim, considerando as propriedades dos metabólitos de microrganismos endofíticos o uso destes como agentes inibidores de biofilmes geradores de corrosão ou

exclusivamente no controle da corrosão inorgânica tende a ser substancialmente consolidados futuramente dentro dos setores industriais, ainda que os trabalhos sejam escassos. O potencial de metabólitos em inibir *in vitro* espécies de microrganismos considerados protagonistas da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é comprovado para endófitos isolados de várias espécies de planta (Muzzamal *et al.*, 2012). Metabólito obtido de endófitos de algas marinhas em extrato cru demonstrou inibir fortemente o crescimento de BRS de forma isolada em biofilme, bem como a produção de sulfeto por esse tipo microbiano, reduzindo assim a taxa de corrosão por perda de massa em aço carbono (Sharad *et al.*, 2016). Em outro ensaio utilizando *Streptomyces lunalinharesii* e outras espécies do mesmo gênero, actinobactérias obtida do solo e que também são consideradas endofíticas de muitas espécies vegetais (Coombs & Franco, 2003), demonstrou atividade antimicrobiana sobre tipos bacterianos aeróbios e anaeróbios envolvidos na CMI, principalmente sobre BRS, agindo na ruptura da membrana celular, como também com inibição sobre a taxa de corrosão (Rosa *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2016). Outras propriedades enzimáticas desse composto também foram demonstradas, concluindo-se que além de propriedade antimicrobiana os metabólitos de endófitos podem apresentar outras potencialidades em associação. Destaca-se que esses trabalhos foram considerados pioneiros na verificação da atividade de metabólitos de endofíticos sobre microrganismos envolvidos na biocorrosão.

Espécies do gênero *Streptomyces*, as mais bem elucidadas na literatura, são reconhecidas na produção de tipos de substâncias com estrutura química simples e de ampla ação *antifouling* (Xu *et al.*, 2010). As principais substâncias produzidas por esse gênero com forte ação antimicrobiana, *antifouling* e também anticorrosiva são enzimas, principalmente do tipo quitinases (Karthink *et al.*, 2015) e substâncias como gramicidinas e compostos da classe das furanonas (Xu *et al.*, 2010). Porém, não se deve restringir a produção de metabólitos como classificados apenas a essas classes químicas. A gama de espécies endofíticas dos mais variados tipos já descobertas e outras centenas ainda não identificadas aumentam substancialmente o espectro de classificação química dos metabólitos (Zhang *et al.*, 2006), existindo produção de substâncias dos mais variados tipos e classes químicas com as mais diversas potencialidades, novas ou não, inclusive como fortes inibidores de corrosão e com atividade antibiofilme (Kusari *et al.*, 2015).

Diferentes classes químicas são elencadas como produzidas ou derivadas do metabolismo secundário de microrganismos endofíticos além das supracitadas, como esteroides, alcaloides, peptídeos e polipeptídeos (Mousa & Raizada, 2013). Entre elas

compostos terpenóides, incluindo di e triterpenos, encontrados na grande maioria dos óleos essenciais também podem ser produzidos por endofíticos, principalmente fungos, associados ou não com espécies de plantas produtoras desses tipos de óleos (Yu *et al.*, 2010). Esses compostos possuem forte ação antimicrobiana e alguns podem atuar como inibidores de corrosão, como já reportados (El-Bribri *et al.*, 2013; Deyab, 2016). A partir dessas propriedades fortalece-se a hipótese da atividade anticorrosiva da grande maioria de metabólitos produzidas por endófitos, apesar de ainda existir poucos estudos do uso dessas substâncias para tais fins, com enfoque principal sobre a corrosão microbiologicamente induzida.

A natureza química do metabólito associado ao tipo de meio e as condições ambientais aos quais serão avaliados são fatores que afetam a efetividade dessas substâncias assim como os demais inibidores de corrosão de origem natural (Montemor, 2016). Da mesma forma, os processos utilizados para a extração e caracterização química, como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética (RMN), dos metabólitos podem não ser tão efetivos em revelar a composição química exata ou total desses compostos (Wu *et al.*, 2016). Nesse aspecto as dificuldades na caracterização química são notórias e podem ser substanciais, principalmente quando se leva em consideração o fato de que a grande maioria de compostos derivados do metabolismo microbiano pode estar na forma de conjugados, como glicoproteínas, glicolipídeos, entre outros, levando à incompleta ou parcial identificação química (Jalgaonwala *et al.*, 2011). Além disso, as dificuldades na caracterização química se potencializam quando a espécie endofítica é nova, pois não há referência na literatura das possíveis substâncias possivelmente produzidas.

4.6.2. Uso de óleos essenciais no controle da CMI

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, ricas em componentes aromáticos derivadas do metabolismo da planta que contribui para inúmeras propriedades de extrema relevância ao vegetal, como defesa, proteção e polinização, essa através da atratividade de seus agentes (Raut *et al.*, 2014). Inúmeras espécies de plantas em vários ecossistemas no mundo são conhecidas por produzirem óleos essenciais, com índices crescentes de cultivo, propagação e comercialização em decorrência das propriedades medicinais e terapêuticas, com destaque para a ação antimicrobiana, principal bioatividade presente nos óleos essenciais

(Ambrosio *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, sendo assim eficiente sobre microrganismos isolados e em biofilme, merece destaque seja pela atuação preventiva de formação como de eliminação sobre a comunidade já estabelecida, interferindo principalmente no mecanismo de *quorum sensing* das espécies (Furletti *et al.*, 2011; Myszka *et al.*, 2016) e no metabolismo energético (Reichling *et al.*, 2009). O Brasil é um dos países mais rico em espécies produtoras de óleos essenciais como reflexo da sua dimensão territorial e da sua grande biodiversidade, com destaque para a Amazônia e os biomas Cerrado e Caatinga (Alves *et al.*, 2000). Gêneros com ampla distribuição no Sertão nordestino são comumente utilizadas pelas populações locais para fins terapêuticos e referência na produção de óleos essenciais para a indústria farmacêutica e cosmética (Cartaxo *et al.*, 2010).

Assim como são bastante explorados pela indústria farmacêutica a utilização dos óleos essenciais pelo setor químico, como forma de controle da corrosão em diferentes tipos industriais, começa a crescer ao longo das últimas décadas (Djouahri *et al.*, 2017). A aplicação como inibidores de corrosão não é algo novo (Mann *et al.*, 1936), entretanto os primeiros ensaios consolidados na literatura são recentes, iniciando-se a partir da década de 80 (Saji, 2010), e as patentes oriundas utilizando óleos essenciais como bioproduto pronto ou como principal fonte de princípios ativos são ainda relativamente poucas, tomando como caso o Brasil. Para controle da CMI as publicações avaliando óleos essenciais ainda são mais restritas, salvo para algumas espécies de microrganismos que estão envolvidas direta ou indiretamente no processo da biocorrosão e que são avaliadas na maioria das vezes *in vitro* e de forma isolada, sem estar em biofilme (Myszka *et al.*, 2016).

Em um dos poucos trabalhos avaliando óleos essenciais contra tipos microbianos específicos envolvidos na CMI, Korenblum *et al.* (2013) verificaram a ação efetiva do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre BRS em biofilme, demonstrando que o principal mecanismo de ação foi a ruptura da parede e membrana celular. O efeito sobre a corrosão também foi verificada por testes gravimétricos. Entretanto, os autores não utilizaram metodologias mais específicas do estudo da corrosão, como impedância e polarização eletroquímica.

Além do óleo essencial de *C. citratus* os óleos essenciais de *Lippia alba* e *Citrus aurantifolia* demonstraram também ação sobre alguns principais gêneros de bactérias redutoras de sulfato (BRS), com destaque sobre *D. alaskensis*. A ação isolada dos componentes majoritários desses óleos essenciais, como citral e eugenol, demonstrou possuir o mesmo percentual de inibição quando comparados ao uso direto dos óleos essenciais (Souza

et al., 2017). Da mesma forma, os autores não analisaram a influência sobre a corrosão e os ensaios foram realizados *in vitro*, com as bactérias isoladas, sem estar em associação em biofilmes.

A escassez de trabalhos avaliando óleos essenciais no controle da CMI deve-se provavelmente a algumas inviabilidades listadas pelo setor industrial, como: o baixo rendimento após o processo de extração, demandando grande quantidade de biomassa vegetal; alta taxa de volatilidade; insolubilidade em meio aquoso, principal meio de veículo utilizado pelas indústrias, além de necessitar de logística operacional específica para aplicação em dutos e tubulações (Gunasekaran & Chauhan, 2004). A fim de aumentar o interesse, ou seja, de atrair mais a atenção os óleos essenciais passaram a ser formulados em sistemas microemulsionados (Solomon *et al.*, 2010), proporcionando significativas vantagens no controle da corrosão, inorgânica ou microbiológica, e aumentando o interesse dos setores acadêmico e, principalmente, do industrial para uso como biocida verde. A ideia de utilizar óleos essenciais em sistemas microemulsionados, que são termodinamicamente mais estáveis e confere maior solubilidade em meio aquoso (Salimi *et al.*, 2013), segue o padrão de eficiência recomendado para outras substâncias químicas utilizadas como inibidores da corrosão e permite ser aplicados em diferentes meios, possibilitando o aumento no rendimento do bioproduto, facilitando as forma de manuseio e aplicação; e ampliando o espectro de ação decorrente da interação facilitada sobre microrganismos e/ou materiais (Silva *et al.*, 2017).

As formulações de microemulsões, para óleos essenciais ou não, são substancialmente mais avaliadas como forma de controle da corrosão em comparação ao uso desses bioprodutos na forma pura. Diferentes tipos de óleo essenciais e não essenciais de espécies vegetais, dos mais variados biomas, foram avaliados sobre a corrosão inorgânica demonstrando excelentes resultados (Lahhit *et al.*, 2011; Almeida, 2012; Adewuyi *et al.*, 2014). Também foi validado que o meio corrosivo utilizado afeta o desempenho da atividade desses bioprodutos formulados, da mesma forma que os não formulados, em sistemas microemulsionados (Pluhár *et al.*, 2016), havendo variações significativas da atividade de meio para meio.

Como forma de prevenção e controle da corrosão microbiológica o uso de óleos essenciais em microemulsão tem sido sugerido por sua forte ação antimicrobiana, agindo diretamente sobre a matriz exopolimérica (EPS), e por interferir na cinética da eletroquímica dos materiais (Falkiewicz-Dulik *et al.*, 2015).

4.7. Microrganismos endofíticos e a biossíntese de óleos essenciais

A presença de endófitos nas espécies vegetais é tão significativa que várias rotas metabólicas, químicas e biológicas são direta ou indiretamente influenciadas, alteradas ou programadas em decorrência da permanência dessa comunidade microbiana, que vem sendo moldada e constantemente modificada ao longo da evolução biológica nesse tipo de interação (Spatafora & Bushley, 2015). Desde o primeiro contato, entre a planta e os microrganismos externos, várias substâncias de diferentes tipos químicos são produzidas através de uma série de reações para proporcionar, de forma inicial, o reconhecimento e a futura colonização. Substâncias destinadas à defesa da planta e hormônios vegetais, responsáveis pelo desenvolvimento e reprodução (Ludwig-Müller, 2015) possuem rotas metabólicas de produção fortemente correlacionadas com o metabolismo dos endófitos, existindo um verdadeiro sinergismo intraespecífico (Kusari *et al.*, 2015).

Dessa forma, se rotas metabólicas são influenciadas nesse tipo de interação ecológica, a produção de subprodutos químicos derivados do metabolismo vegetal, como os óleos essenciais, bem como sua composição química e rendimento podem sofrer influência pela presença de microrganismos endofíticos? Essa questão foi confirmada por Giudice *et al.* (2008) ao analisarem que bactérias endofíticas podem influenciar a biossíntese de óleos essenciais, através da metabolização de compostos químicos e fornecimento de precursores envolvidos no ciclo, além da permuta gênica entre microrganismos e planta. Contudo, os mecanismos exatos de como ocorrem são bastante específicos e dependentes do tipo das espécies envolvidas, havendo um amplo campo a ser investigado.

Destaca-se que a influência contrária também é válida, ou seja, microrganismos endofíticos são fortemente afetados pela biossíntese de óleos essenciais, possuindo distribuição preferencial e peculiar em diferentes estruturas da planta (Silva *et al.*, 2013). A propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais inicia impondo a seleção dos futuros endófitos pela planta (Junker & Tholl, 2013) e limitando, a *posteriori*, sua distribuição para partes mais específicas do vegetal, de forma a não entrar diretamente em contato com células especializadas na produção dos óleos essenciais (Miguel *et al.*, 2017). O fator importante, e ao mesmo tempo paradoxal, dessa limitação é a localização estratégica que os endófitos assumem, mantendo-se de forma mais próxima às células secretoras do óleo essencial e viabilizando sua cooperação na biossíntese, ao mesmo tempo em que a maioria dos compostos químicos sintetizados é altamente tóxica para suas atividades vitais (Siqueira *et al.*,

2011). O espectro de ação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode tornar-se, assim, mais potente quando o microrganismo endofítico é identificado pela planta como um antigo patógeno na história evolutiva. Há um reconhecimento bioquímico em que limita a entrada e proporciona a distribuição desse antigo patógeno a estruturas biológicas mais afastadas da biossíntese dos óleos essenciais no interior da planta (Copetta *et al.*, 2006), condição contrária do que habitualmente ocorre com endofíticos não considerados patógeno antigo. Ainda é difícil detalhar toda essa influência devido à falta de metodologias que possibilitem estudar mais profundamente a inter-relação planta-hospedeiro *in loco* já que a simples retirada dos microrganismos para cultivo e experimentação *in vitro* muda todos os tipos de relações anteriormente existentes e consolidadas (Ngoma *et al.*, 2014).

As propriedades medicinais e terapêuticas características dos óleos essenciais podem também sofrer alterações na atividade em decorrência da variação na composição química ocasionada pela influência dos endofíticos (Aparajita Das *et al.*, 2012). A variação da microbiota durante todo o ciclo de vida da planta é apontada por ser um dos fatores responsáveis pelas conseqüentes alterações dessas propriedades (Brader *et al.*, 2014). O interesse por biomoléculas que agregam diferentes propriedades bioativas, e sabendo-se da influência dos endófitos na sua biossíntese a prospecção de tais microrganismos, aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Nos estudos realizado por Emiliani *et al.* (2014) e Maida *et al.* (2014) foi demonstrado que os metabólitos produzidos pela microbiota endofítica possuem a mesma potencialidade antimicrobiana do óleo essencial em uma mesma espécie vegetal, havendo uma possível similaridade química entre as substâncias presentes nos dois bioprodutos. Assim, abre uma possibilidade de existência de recombinação genética direta entre planta e endofíticos. Mais recentemente em uma revisão realizada por Jia *et al.* (2016) sobre os propriedades proporcionados pelos endofíticos, verificou-se que as substâncias ativas acumuladas no interior do vegetal produzidas pelos endofíticos podem na verdade constituir diretamente bioprodutos “prontos”, sem nenhuma participação do metabolismo da planta hospedeira, ou precursores nas rota de biossíntese. Nessa prerrogativa Kumara *et al.* (2013) relatam que os diferentes compostos químicos produzidos por endófitos pode ser conseqüência da presença de genes próprios, não idênticos ao do hospedeiro, e que a similaridade químicas de algumas substâncias seria explicada pela história evolutiva e adaptativa entre esses organismos. Destaca-se que microrganismos endofíticos cultivados *in vitro* podem ainda produzir substâncias químicas que nunca produziriam dentro da espécie vegetal, sendo o contrário também verdadeiro (Ludwing-Müller, 2015).

O fato é que distinguir o que é produto derivado do metabolismo microbiano entre o gerado apenas pela planta ainda constitui tarefa difícil dentro da complexidade dessa interação e pela quase inexistência de metodologias apropriadas. Contudo, o uso de ambos em associação ou de forma isolada representa substancialmente novas potencialidades biotecnológicas que podem ser aplicadas nos mais variados setores.

5. Referências:

ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N-E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p 453–472, 2014.

ABDEL-AZEEM, A.M.; ZAKI, S.M.; KHALIL, W.F.; MAKHLOUF, N.A.; FARGHALY, L.M. Anti-rheumatoid activity of secondary metabolites produced by endophytic *Chaetomium globosum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1477, p. 1-11, 2016.

ABDOLAH, A.; HAMZAH, E.; IBRAHIM, Z.; HASMIM, S. Application of environmentally-friendly coatings toward inhibiting the Microbially Influenced Corrosion (MIC) of steel: a review. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 702-745, 2014.

ABRACO – Associação Brasileira de Corrosão. (2016) – **Boletim técnico: Dados estatísticos da corrosão no Brasil e no mundo**. Rio de Janeiro, 2016.

ADEWUYI, A.; GOPFERT, A.; WOLFL, T. Succinyl amide gemini surfactante from *Adenopus breviflorus* seed oil: a potential corrosion inhibitor of mild steel in acidic medium. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 439-449, 2014.

AGUILAR-TRIGUEROS, C.A.; RILLIG, M.C. Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 22, p. 8149-8158, 2016.

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.L.R.; WILLADINO, L.; JÚNIOR, C.M.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 527–535, 2006.

ALMEIDA, C.C. **Avaliação de inibidores verdes microemulsionados na inibição à corrosão do aço carbono AISI 1020**. 85 f. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA, JR.A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMBROSIO, C.M.S.; ALENCAR, S.M.; SOUSA, R.L.M.; MORENO, A.M.; GLORIA, E.M. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 128-136, 2017.

APARAJITA, D.; KAMAL, S.; SHAKIL, N.J.; SHERAMETI, I.; OELMÜLLER, R.; DUA, M.; TUTEJA, N.; JOHRI, A.K.; VARMA, A. The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 1, p. 103-112, 2012.

APILÁNEZ, I.; GUTIÉRREZ, A.; DIÁZ, M. Effect of surface materials on initial biofilm development. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 225-230, 1998.

ARAÚJO, E.L.; CASTRO, C.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of Brazilian Caatinga – A review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2007.

ARAÚJO, W.I. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 85 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

ARENAS, J. PAGANELLI, F.L.; RODRÍGUEZ-CASTAÑO, P.; CANO-CRESPO, S.; ENDE, A.; PUTTEN, J.P.M.; TOMMASSEN, J. Expression of the gene for autotransporter AutB of *Neisseria meningitidis* affects biofilm formation and epithelial transmigration. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 6, n. 162, p. 1-16, 2016.

ASH, C. Redox metabolite role in biofilms. **Science**, v. 355, n. 6321, p. 143-145, 2017.

ASHRAF, M.A.; ULLAH, S.; AHMAD, I.; QURESHI, A.K.; BALKHAIR, K.S.; REHMAN, M.A. Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. **Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 388-403, 2013.

AZEVEDO, J.L.; JUNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BAJPAI, P. Chapter 4 – Factors affecting biofilm development. **Pulp and Paper Industry**, p. 53-65, 2015.

BALSANELLI, E.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PlosOne**, v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.

BARTUSKA, A. Beyond desertification. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 1, p. 3, 2015.

BARY, A. **Morphologie and physiologie der Pilze, Flechten and Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, 1866.

BASSOLE, H.N.; OUATTARA, A.S.; NEBIE, R.; OUATTAR, C.A.T.; KABORE, Z.I.; TRAORE, S.A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, p. 209-212, 2002.

BATMANGHELICH, F.; LI, L.; SEO, Y. Influence of multispecies biofilms of

Pseudomonas aeruginosa and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron. **Corrosion Science**, v. 121, p. 94-104, 2017.

BATTIN, T.J.; BESEMER, K.; BENGTSSON, M.M.; ROMANI, A.M.; PACKMANN, A.I. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 251–263, 2016.

BEAM, J.P.; BERNSTEIN, H.C.; JAY, Z.J.; KOZUBAL, M.A. Assembly and succession of iron oxide microbial mat communities in acidic geothermal springs. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 25, p. 1-15, 2016.

BEECH, I.B.; SMITH, J.R.; STEELE, A.A.; PENEGAR, I.; CAMPBELL, S.A. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 23, n. 2-3, p. 231-247, 2002.

BEECH, I.B.; SUNNER, J.A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, v. 8, p. 157-168, 2005.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecologia: De indivíduos a Ecosistemas**. 4ª ed. São Paulo: ARTMED, 2007. 752p.

BENETTON, X.D. **Biocomplexity and bioelectrochemical influence of biofilms in carbon steel deterioration: A transmission lines approach for electrochemical impedance analysis**. 236 f. Tese (Doutorado), Mexican Petroleum Institute, México, 2007.

BITU, V.; BOTELHO, M.A.; COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; VERAS, H.N.H.; MARTINS, K.T.; LYRA, A.; COLUCHI, G.G.; RUELA, R.S.; QUEIROZ, D.B.; SIQUEIRA, J.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracillis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BORENSTEIN, S.W. **Microbiologically Influenced Corrosion**. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 1994.

BOURGAUD, F. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRIBRIA, A.E.; TABYAOUI, M.; TABYAOUI, B.; EL ATTARI, H.; BENTISS, F. The use of *Euphorbia falcata* extract as eco-friendly corrosion inhibitor of carbon steel in hydrochloric acid solution. **Materials Chemistry and Physics**, v. 141, n. 1, p. 240-247, 2013.

BURMOLLE, M.; REN, D.; BJAMSHOLT, T.; SORENSEN, S. Interactions in

multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84-91, 2014.

BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 24-32, 1997.

CALIARI, F.R.; ROSA, E.F.; SILVA, M.A.; REIS, D.A.P. Analysis of pitting corrosion on the Inconel 718 alloy submitted to aging heat treatment. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 11, n. 3, p. 189-194, 2014.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medical plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CASTILLO, U.; HARPER, J.K.; STROBEL, G.A.; SEARS, J.; ALESI, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVER, D.; JAMES, B.; PORTER, J.H.; MILLAR, R.R.D.; HESS, W.M.; DAVID, M.C.; TEPLow, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.

CENTENO-LEIJA, S.; GUZMÁN-TRAMPE, S.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; BAUTISTA-TOVAR, D.; ESPINOSA, A.; TRENADO, M.; SÁNCHEZ, S. **New weapons to control bacterial growth** (ebook). Biomedical and Life Sciences. p. 395-431, 2016.

CHAMBERS, L.D.; WHARTON, J.A.; WOODA, R.J.K.; WALSHA, F.C.; STOKES, K.R. Techniques for the measurement of natural product incorporation into an antifouling coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, n. 2, p. 473-484, 2014.

CHEN, L.M.; CHAI, L.H. A theoretical analysis on self-organized formation of microbial biofilms. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 370, n. 2, p. 793-807, 2006.

CHEN, Y.; TANG, Q.; SENKO, J.M.; CHENG, G.; NEWBY, B.Z.; CASTANEDA, H.; JU, L.Q. Long-term survival of *Desulfovibrio vulgaris* on carbon steel and associated pitting corrosion. **Corrosion Science**, v. 90, p. 89-100, 2015.

CLOETE, T.E.; JACOBS, L.; BROZEL, V.S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, v. 9, n. 1., p. 23-37, 1998.

COCKING, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 169-175, 2003.

COCQ, K.L.; GURR, S.J.; HIRSCH, P.R.; MAUCLINE, T.H. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 469-473, 2016.

- COUILLEROT, O.; VATSA, P.; SOUAD, L.; BARKA, E.A. Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulatus* S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities. **Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens**, v. 86, p. 271-276, 2013.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.
- COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, G.J.; GANG, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 1, p. 188-197, 2011.
- COOMBS, J.T.; FRANCO, C.M.M. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. **Applied and Environmental Environmental Microbiology**, v.69, n. 7, p. 4260–4262, 2003.
- COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. **Mycorrhiza**, v. 16, n. 7, p. 485–494, 2006.
- COSTA, T.C.C.; COSTA, T.C.C; OLIVEIRA, M.A.J.; ACCIOLY, L.J.O.; SILVA, F.H.B.B. Análise da degradação da caatinga no núcleo de desertificação do Seridó (RN/PB). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 961-974, 2009.
- COSTERTON, J. W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 453-464, 1999.
- DANG, H.; LOVELL, C.R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91-138, 2016.
- DAPA, T.; LEUZZI, R.; NG, Y.K.; BABAN, S.T.; ADAMO, R.; KUEHNE, S.A.; SCARSELLI, M.; MINTON, N.P.; SERRUTO, D.; UNNIKRIISHNAN, M. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 545-555, 2012.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.
- DE SOUZA, J.T.; TROCOLI, R.O.; MONTEIRO, F.P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, p. 25-32, 2016.

DEYAB, M.A. Corrosion inhibition of aluminum in biodiesel by ethanol extracts of Rosemary leaves. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 58, p. 536-541, 2016.

DJOUAHRI, A.; SEBIANE, S.; KELLOU, F.; LAMARI, L.; SABAOU, N.; BAALIOUAMER, A.; BOUDARENE, L. Inhibitory effect on corrosion of carbon steel in acidic media, antioxidant, antimicrobial, anti-5-lipoxygenase and anti-xanthine oxidase activities of essential oil from *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 2, p. 169-178, 2017.

DOBRETSOV, S.; DAHMS, H-U.; YILI, H.; WAHL, M.; QIAN, P-Y. The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 177-188, 2006.

DOLEY, P.; JHA, D.Q. Antimicrobial activity of bacterial endophytes from medicinal endemic plant *Garcinia lancifolia* Roxb. **Annals of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 1243-1247, 2015.

DONG, Z.H.; LIU, T.; LIU, H.F. Influence of EPS isolated from thermophilic sulphate-reducing bacteria on carbon steel corrosion. **Biofouling**, v. 27, n. 5, p. 487-495, 2011.

ELKHAYAT, E.S.; IBRAHIM, S.R.M.; MOHAMED, G.A.; ROSS, S.A. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 30, n. 7, p. 814-820, 2015.

EMERSON, D. Biochemistry and microbiology of microaerobic Fe (II) oxidation. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 1211-1216, 2012.

EMILIANI, G.; MENGONI, A.; MAIDA, I.; PERRIN, E.; CHIPELLINI, C.; FONDI, M.; GALLO, E.; GORI, L.; MAGGINI, V.; VANNACCI, A.; BIFFI, S.; FIRENZUOLI, F.; FANI, R. Linking bacterial endophytic communities to essential oils: clues from *Lavandula angustifolia* Mill. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

EXPÓSITO, O.; BONFILL, M.; MOYANO, E.; ONRUBIA, M.; MIRJALILI, M.H.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 109-121, 2009.

FALKIEWIEZ-DULIK, M.; JANDA, K.; WYPYCH, G. **Biodegradation, biodeterioration and biostabilization**. 2ª ed. Toronto: ChemTec Publishing, 2015.

FATIMA, N.; MUHAMMA, S.A.; KHAN, I.; QAZI, M.A.; SHAHZADI, I.; MUMTAZ, A.; HASHMI, M.A.; KHAN, A.K.; Ismail, T. *Chaetomium* endophytes: a repository of pharmacologically active metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 136, p. 1-6, 2016.

- FELIPE, M.B.M.C. **Avaliação de espécie vegetal *Croton cajucara* Benth como inibidor de biocorrosão em aço carbono AISI 1020**. 147 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S. Cytotoxic effect of leaf essential oil from *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615-621, 2013.
- FIGUEREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.
- FINSGAR, M.; JACKSON, J. Application of corrosion inhibitors for steels in acidic media for the oil and gas industry: a review. **Corrosion Science**, v. 86, p. 17-41, 2014.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FRANKLIN, M.J.; STEWART, P.S. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.
- FURLETTI, V.F.; TEIXEIRA, I.P.; OBANDO-PEREDA, G.; MARDEGAN, R.C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, R.M.T.; REHDER, V.L.G.; DUARTE, M.C.T.; HOFING, J.F. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- GALLEGO, A.; MALIK, S.; YOUSEFZADI, M.; MAKHZOUM, A.; TREMOUILLAUX-GUILLER, J.; BONFILL, M. Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 129, n. 1, p. 1-16, 2017.
- GAMBINO, M.; CAPPITTELLI, F. Biofilm responses to oxidative stress. **Biofouling**, v. 2, p. 167-178, 2016.
- GARG, N.; MANCHANDA, G.; KUMAR, A. Bacterial quorum sensing: circuits and applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 2, p. 289-305, 2014.
- GENTIL, V. **Corrosão**. 2ª ed., São Paulo: LTC, 1999.
- GENTIL, V. **Corrosão**. 6ª ed. São Paulo: LTC, 2011.
- GIUDICE, L.D.; MASSARDO, D.R.; PONTIERI, P.; BERTEA, C.M.; MOMBELLO, D.; CARATA, E.; TREDICI, S.M.; TALÀ, A.; MUCCIARELLI, M.; GROUDEVA, V.I.; DE STEFANO, M.; VIGLIOTTA, G.; MAFFEI, M.E.; ALIFAN, P. The microbial community of Vetiver root and its involvement into

essential oil biogenesis. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2824–284, 2008.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GU, J-D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 69-91, 2003.

GU, T. New understandings of biocorrosion mechanisms and their classifications. **Journal of Microbiology & Biochemistry Technology**, v. 4, p. iii-iv, 2012.

GU, T. Theoretical modeling of the possibility of acid producing bacteria causing fast pitting biocorrosion. **Microbial & Biochemical Technology**, v. 6, n. 2, p. 68-74, 2014.

GUALDRÓN, A.F.; BECERRA, E.N.; PEÑA, D.Y.; GUTIÉRREZ, J.C.; BECERRA, H.Q. Inhibitory effect of Eucalyptus and *Lippia alba* essential oils on the corrosion of mild steel in hydrochloric acid. **Journal of Material Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 143-158, 2013.

GUARRO, J.; SOLER, L.; RINALDI, M. Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 613-618, 1995.

GUIAMET, P.S.; SARAVIA, S.G.G.; ARENAS, P.; PÉREZ DE LA PAZ, M.L.; BORREGO, S.F. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. **Pharmacology Online**, v. 3, p. 537-544, 2006.

GUILHEN, C.; FORESTIER, C.; BALESTRINO, D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. **Molecular Microbiology**, v. 1, p. 1-23, 2017.

GUIMARÃES, A.G.; GOMES, S.V.F.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; FERREIRA, A.G.; BLANK, A.F.; SANTOS, A.D.C.; VIANA, M.D.; SILVA, G.H.; JÚNIOR, L.J.Q. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 3, p. 428-434, 2012.

GUNASEKARAN, G.; CHAUHAN, L.R. Eco friendly inhibitor for corrosion inhibition of mildsteel in phosphoric acid médium. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 25, p. 4387-4395, 2004.

HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

- HE, Y.; TIAN, J.; CHEN, X.; SUN, W.; ZHU, H.; LI, Q.; LEI, L.; YAO, G.; XUE, Y.; WANG, J.; LI, H.; ZHANG, Y. Fungal naphtho- γ -pyrones: Potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.
- HERRERA, S.D.; GROSSIA, C.; ZAWOZNIKA, M.; GROPP, M.D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v. 186-187, p. 37-43, 2016.
- HYUN, Y.; KIM, H.; KIM, Y.H. Effects of chloride and crevice on corrosion resistance of stainless steels buried in soil within Seoul Metropolitan. **Metals and Materials International**, v. 20, n. 2, p. 249-260, 2014.
- HOFER, U. Biofilms: Turning tides for quorum sensing. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 64-65, 2016.
- HONG, S.H.; HEGDE, M.; KIM, J.; WANG, X.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T.K. Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device. **Nature Communications**, v. 3, p. 1-8, 2012.
- IBRAHIM, S.R.M.; ABDALLAH, H.M.; MOHAMED, G.A.; ROSS, S.A. Integracides H-J: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Fitoterapia**, v. 112, p. 161-167, 2016.
- JALGAONWALA, R.E.; MOHITE, B.V.; MAHAJAN, R.T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- JAVAHERDASHTI, R. "How corrosion affects industry and life". **Anti-Corrosion Methods and Materials**, v. 47, n. 1, p. 30-34, 2000.
- JAVAHERDASHTI, R. **Microbiologically Influenced Corrosion: A Engineering Insight**. 2^a ed. Springer: Austrália, 215p. 2016.
- JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H-L.; ZHENG, C-J.; RAHMAN, K.; HAN, T.; QIN, L-P. A Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 906, p. 1-14, 2016.
- JUNKER, R.R.; THOLL, D. Volatile organic compound mediated interactions at the plant-microbe interface. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 7, p. 810-825, 2013.
- KAPLAN, J.B.; VELLIYAGOUNDER, K.; RAGUNATH, C.; ROHDE, H.; MACK, D.; KNOBLOCH, J.K.M.; RAMASUBBU, N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8213-8220, 2004.

KAPLAN, J.B. Biofilm dispersal. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205-218, 2010.

KARUNARATNE, D.N.; PAMUNUWA, G.; RANATUNGA, U. **Properties and Uses of Microemulsions**. INTECH e-books, 2017.

KIM, E-S. DATTA, T.; KIM, J.B.; LEE, G.; CHOI, J. Biological fixed film. **Water Environment Research**, v. 87, n. 10, p. 974-999, 2015.

KIP, N.; VEEN, J.A. The dual role of microbes in corrosion. **The ISME Journal**, v. 9, p. 542-551, 2015.

KOCH, T. **Microbial Induced Corrosion**. In: Encyclopedia of Lubricants and Lubrication. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014.

KORENBLUM, E.; GOULART, F.R.V.; RODRIGUES, I.A.; ABREU, F.; LINS, U.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; VALONI, E.; SEBASTIÁN, G.V.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; SELDIN, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, v. 3, n. 44, p. 1-8, 2013.

KUMAR DAS, S.; PATRA, J.K.; THATOI, H. Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: a review. **International Review of Hydrobiology**, v. 101, p. 3-19, 2016.

KUMARA, P.M.; SHWETA, S.; VASANTHAKUMARI, M.M.; SACHIN, N.; MANJUNATHA, B.L.; JADHAV, S.S.; RAVIKANTH, G.; GANESHAIAH, K.N.; SHAANKER, R.U. **Advances in Endophytic Research**, v.1, p. 177-179, 2014.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnonology. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 304-311, 2014.

KUSARI, P.; KUSARI, S.; SPITELLER, M.; KAYSER, O. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5383-5390, 2015.

KWON, K. **Marine OMICS: Principles and Applications** (e-book). Broken Sound Parkway: Taylor & Francis Group. p. 383-405, 2016.

LAHHIT, N.; BOUYANZER, A.; DESJOBERT, J.M.; HAMMOUTI, B.; SALGHI, R.; COSTA, J.; JAMA, C.; BENTISS, F.; MAJIDI, L. Fennel (*Foeniculum vulgare*) essential oil as green corrosion inhibitor of carbon steel in hydrochloric acid solution. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 29, n. 2, p. 127-138, 2011.

LARRAN, S.; SIMÓN, M.R.; MORENO, M.V.; SIURANAE, M.P.S.; PERELLÓ, A. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. **Biological Control**, v. 92, p. 17-23, 2016.

- LASPIDOU, C.S.; RITTMANN, B.E. Modeling the development of biofilm density including active bacteria, inert biomass, and extracellular polymeric substances. **Water Research**, v. 38, n. 14-15, p. 3349-3361, 2004.
- LEVENSON, Y.; EMMANUEL, S. Pore-scale heterogeneous reaction rates on a dissolving limestone surface. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 119, n. 15, p. 188-197, 2013.
- LI, W.; YANG, X.; YANG, Y.; DUANG, R.; CHEN, G.; LI, X. Anti-phytopathogen, multi-target acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of metabolites from endophytic *Chaetomium globosum*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 30, n. 22, p. 2616-2619, 2016.
- LITTLE, B.; LEE, J.; RAY, R. A review of 'green' strategies to prevent or mitigate microbiologically influenced corrosion. **Biofouling**, v. 23, n. 2, p. 87-97, 2007.
- LIU, H.; GU, T.; ASIF, M.; ZHANG, G.; LIU, H. The corrosion behavior and mechanism of carbon steel induced by extracellular polymeric substances of iron-oxidizing bacteria. **Corrosion Science**, v. 114, p. 102-111, 2017.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; YUAN, J. Influence of produced water with high salinity and corrosion inhibitors on the corrosion of water injection pipe in Tuha oil field. **Engineering Failure Analysis**, v. 45, p. 225-233, 2014.
- LOOSDRECH, M.C.M.; EIKEBOOM, D.; GJALTEMA, A.; MULDER, A.; TIJHUIS, L.; HEIJNEN, J.J. Biofilm structures. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 35-43, 1995.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2002.
- LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p. 1325-1334, 2015.
- LV, J.; WANG, Y.; ZHONG, C.; LI, Y.; HAO, W.; ZHU, J. The effect of quorum sensing and extracellular proteins on the microbial attachment of aerobic granular activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 53-58, 2014.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; DA SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823, 1998.
- MAIDA, I.; NOSTRO, A.; PESAVENTO, G. Exploring the anti-Burkholderia cepacia complex activity of essential oils: a preliminary analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- MANN, C.A.; LAUER, B.E.; HULTIN, C.T. Organic inhibitors of corrosion, aliphatic amines. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 159-163, 1936.

MANSOURI, H.; ALAVI, S. A.; FOTOVAT, M. Microbial-Influenced Corrosion of corten steel compared with carbon steel and stainless steel in oily wastewater by *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society (TMS)**, v. 67, n. 5, p. 1594-1600, 2015.

MARCHESE, A.; ORHANB, I.E.; DAGLIAC, M.; BARBIERIA, R.; DI LORENZOC, A.; NABAVID, S.F.; GORTZIE, O.; IZADIF, M.; NABAVID, S.M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402-414, 2016.

MASIC, A.; BENGTSSON, J.; CHRISTENSSON, M. Measuring and modeling the oxygen profile in a nitrifying Moving Bed Biofilm Reactor. **Mathematical Biosciences**, v. 227, n. 1, p. 1-11, 2010.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998.

MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MIGUEL, P.S.B.; DELVAUX, J.C.; OLIVEIRA, M.N.V.; MOREIRA, B.C.; BORGES, A.C.; TOTOLA, M.R.; NEVES, J.C.L.; COSTA, M.D. Diversity and distribution of the endophytic fungal community in eucalyptus leaves. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 3, p. 92-105, 2017.

MOLONEY, M.G. Natural products as a source for novel antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.

MONTEMOR, M.F. Fostering green inhibitors for corrosion prevention. **Active Protective Coatings**, v. 233, p. 107-137, 2016.

MORADI, M.; SONG, Z.; NIE, X.; YAN, M.; HU, F.Q. Investigation of bacterial attachment and biofilm formation of two different *Pseudoalteromonas* species: Comparison of different methods. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 65, p. 70-78, 2016.

MORAES, E.M.; YOTOKO, K.S.C.; MANFRIN, M.H.; SOLFERINI, V.N.; SENE, F.M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136-2147, 2009.

MOREIRA, J.M.R. **Analysis of factors controlling the onset of bacterial biofilms**. Dissertação (Doutorado). 160 f. Faculdade de Engenharia Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal, 2014.

MOTA-NETO, R.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, V.S.; MELO, M.C.N.; CARVALHO, C.B.M.; GUIMARÃES, S.B.; PESSOA, O.D.L.; SILVA, S.L.;

- SILVA, S.F.R.; VASCONCELOS, P.R.L. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.
- MOULI, K.C.; PRAGATHI, D.; JYOTHI, U.N.; KUMAR, V.S.; NAIK, M.H.; BALANANDA, P.; SUMAN, B.; REDDY, V.S.; VIJAYA, T. Leptin inhibitors from fungal endophytes (LIFEs): Will be novel therapeutic drugs for obesity and its associated immune mediated diseases. **Medical Hypotheses**, v. 92, p. 48-53, 2016.
- MOUSA, W.K.; RAIZADA, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 65, p. 1-18, 2013.
- MOYA, P.; PEDEMONTE, D.; AMENGUAL, S.; FRANCO, M.E.E.; SISTERN, M.N. Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent of barley foliar diseases. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 51, n. 4, p. 569-578, 2016.
- MURER, N.; BUCHHEIT, R.G. Stochastic modeling of pitting corrosion in aluminum alloys. **Corrosion Science**, v. 69, p. 139-148, 2013.
- MURPHY, B.R.; DOOHAN, F.M., HODKINSON, T.R. Fungal root endophytes of a wild barley species increase yield in a nutrient-stressed barley cultivar. **Symbiosis**, v. 65, n. 1, p. 1-7, 2015.
- MUZZAMAL, H.; SARWAR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, n. 1, p. 249-257, 2012.
- MYSZKA, K.; SCHMIDT, M.; MAJCHER, M.; JUZWA, W.; OLKOWICZ, M.; CZACZYK, K. Inhibition of *quorum sensing*-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 252-259, 2016.
- NGOMA, L.; MOGATLANYANE, K.; BABALOLA, O.O. Screening of endophytic bacteria towards the development of cottage industry: an *in vitro* study. **Journal of Human Ecology**, v. 47, n. 1, p. 45-63, 2014.
- NUNES, L.P. **Fundamentos de Resistência à Corrosão**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2007.
- NWODO, U.U.; GREEN, E.; OKOH, A.I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002-14015, 2012.
- OKABE, S.; ITOH, T.; SATOH, H.; WATANABE, Y. Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater

- biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 5107-5116, 2000.
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.
- OTEIO, N.; LALLY, R.D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, K.J.; DOWLING, D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 745, p. 1-9, 2015.
- PALOU, R.M.; XOMELT, O.O.; LIKHANOVA, N.V. **Environmentally friendly corrosion inhibitors**. In: ALIOFKHAZRAEI, M. Developments in Corrosion Protection. 1ª ed. INTECH, 2014.
- PANOZZO, L.E.; ZUCHI, J.; PINHO, D.B.; NICOLI, A.; MAGANO, D.A.; STOHLIRCK, L.; DIAS, D.C.F.S. Micro-organismos associados a sementes de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p. 618-622, 2013.
- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PATNI, N.; AGARWAL, S.; SHAH, P. Greener approach towards corrosion inhibition. **Chinese Journal of Engineering**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- PEREIRA, S.L.S.; PRAXEDES, Y.C.M.; BASTOS, T.C.; ALENCAR, P.N.B.; COSTA, F.N. Clinical effect of a gel containing *Lippia sidoides* on plaque and gingivitis control. **European Journal of Dentistry**, v. 7, p. 28-34, 2013.
- PESSOA, O.D.L.; CARVALHO, C.B.M.; SILVESTRE, J.O.V.L.; LIMA, M.C.L.; NETO, R.M.; MATOS, F.J.A.; LEMOS, T.L.G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *gracillis*. **Fitoterapia**, v. 76, n.7-8, p. 712-714, 2005.
- PIETRA, F. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. **Natural Product Reports**, v. 14, n. 5, p. 433-452, 1997.
- PLUHÁR, Z.; SZABÓ, D.; SÁROSI, S. Effects of different factors influencing the essential oil properties of *Thymus vulgaris* L. **Plant Science Today**, v. 3, n. 3, p. 312-326, 2016.
- PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003.
- QIAN, J.; HORN, H.; TARCHITZKY, J.; CHEN, Y.; KATZ, S.; WAGNER, M. Water quality and daily temperature cycle affect biofilm formation in drip irrigation

devices revealed by optical coherence tomography. **Biofouling**, v. 33, n. 3, p. 211-221, 2017.

RAJA, P.B.; SETHURAMAN, M.G. Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media – A review. **Materials Letters**, v. 62, n. 1, p. 113-116, 2008.

RAJALA, P.; BOMBERG, B.; VEPSALAINEN, M.; CARPÉN, L. Microbial fouling and corrosion of carbon steel in deep anoxic alkaline groundwater. **Biofouling**, v. 33, n. 2, p. 195-209, 2017.

RANI, B.E.A.; BASU, B.B.J. Green inhibitors for corrosion protection of metals and alloys: an overview. **International Journal of Corrosion**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RAY, R.I.; LEE, J.S.; LITTLE, B.J. Iron-oxidizing bacteria: a review of corrosion mechanisms in fresh water and marine environments. **NACE International**, n. 10218, p. 1-16, 2010.

REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, R.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1581, 2002.

REFAIT, P.; JEANNIN, M.; SABOT, R.; ANTONY, H.; PINEAU, S. Corrosion and cathodic protection of carbon steel in the tidal zone: Products, mechanisms and kinetics. **Corrosion Science**, v. 90, p. 375-382, 2015.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties: an overview. **Forsch Komplemented**, v. 16, n. 2, p. 79-90, 2009.

RENDUELES, O.; GHIGO, J-M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 1-18, 2012.

RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RIELLAA, K.R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R.N.; CARDOSO, J.C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; THOMAZZI, S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656–663, 2012.

RINAUDI, L.V.; GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 1, p. 1-11, 2010.

RODRÍGUEZ, K.; STCHIGEL, A.M.; CANO, J.F.; GUARRO, J. A new species of *Achaetomium* from Indian soil. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 77-82, 2004.

ROSA, J.P.; KORENBLUM, E.; FRANCO-CIRIGLIANO, M.N.; ABREU, F.; LINS, U.; SOARES, R.M.A.; MACRAE, A.; SELDIN, L.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces lunalinharesii* strain 235 shows the potential to inhibit bacteria involved in biocorrosion processes. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

ROSA, J.P.; TIBÚRCIO, S.R.; MARQUES, J.M.; SELDIN, L.; COELHO, R.R. *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 603-609, 2016.

ROSCHÉ, B.; LI, X.Z.; HAUER, B.; SCHMID, A.; BUEHLER, K. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 636-643, 2009.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytic: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SABA, B.; CHRISTY, A.D.; YU, Z.; CO, A.C.; ISLAM, R.; TUOVINEN, O.H. Characterization and performance of anodic mixed culture biofilms in submersed microbial fuel cells. **Bioelectrochemistry**, v. 113, p. 79-84, 2017.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.

SAJI, V.S. A review on recent patents in corrosion inhibitors. **Recent Patents on Corrosion Science**, v. 2, p. 6-12, 2010.

SALIMI, A.; ZADEH, B.S.M.; MOGHIMIPOUR, E. Preparation and characterization of cyanocobalamin (Vit B12) microemulsion properties and structure for topical and transdermal application. **Iran Journal Basic Medical Science**, v. 16, n. 7, p. 865-872, 2013.

SANDLE, T. Bacterial adhesion: an introduction. **Peer Reviewed: Microbiology**, v.1, p.1-9, 2013.

SCHOENROCK, K.M.; AMSLER, C.D.; McCLINTOCK, J.B.; BAKER, B.J. A comprehensive study of Antarctic algal symbioses: minimal impacts of endophyte presence in most species of macroalgal hosts. **European Journal of Phycology**, v. 50, n. 3, p. 271-278, 2015.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SEGUI, J.A. Simulation-led strategy for corrosion prevention. **Corrosion, Materials Science**, p. 36-38, 2014.

- SELIM, K. A., EL-BEIH, A. A., ABDEL-RAHMAN, T. M., AND EL-DIWANY, A. I. Biological evaluation of endophytic fungus, *Chaetomium globosum* JN711454, as potential candidate for improving drug discovery. **Cell Biochemistry Biophysics**, v. 68, p. 67–82, 2014.
- SHARAD, A.A.; USUPB, G.; SAHRANI, F.K.; AHMAD, A. Inhibition of the planktonic and sessile growth and biocorrosion of *Desulfovibrio* sp. solution which is isolated from crude oil fluid by the ethyl acetate extraction from marine *Alcaligenes faecalis* for carbon steel protection. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 233-243, 2016.
- SIKES, B.A.; HAWKES, C.V.; FUKAMI, T. Plant and root endophyte assembly history: interactive effects on native and exotic plants. **Ecology**, v. 97, n. 2, p. 484-493, 2016.
- SILVA, N.A.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L.C.B.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, R.A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006a.
- SILVA, T.F.; VOLLÚ, R.E.; JURELEVICIUS, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; BLANK, A.F.; SELDIN, L. Does the essential oil *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect in endophytic microbial community? **BMC Microbiology**, v. 13, n. 29, p. 1-14, 2013.
- SILVA, V.C.; RODRIGUES, C.M. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 14, p. 1-6, 2014.
- SILVA, A.C.M.; MOGHADAM, A.D.; SINGH, P.; ROHATGI, P.K. Self-healing composite coatings based on in situ micro-nanoencapsulation process for corrosion protection. **Journal of Coatings Technology and Research**, p. 1-29, 2017.
- SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. **Journal of Basic Microbiology**. v. 47, p. 174–183, 2007.
- SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 389-397, 2006.
- SIQUEIRA, V.M.; CONTI, R.; ARAÚJO, J.M.; MOTTA, C.M.S. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, p. 89-95, 2011.
- SOARES, B.V.; DIAS, T.M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOLOMON, M.M.; UMOREN, S.A.; USODORO, I.I.; UDOH, A.P. Inhibitive and adsorption behaviour of carboxymethyl cellulose on mild steel corrosion in sulphuric acid solution. **Corrosion Science**, v. 52, n. 4, p. 1317-1325, 2010.

SONI, S. K.; SONI, R. Regulation of cellulase synthesis in *Chaetomium erraticum*. **BioResources**, v. 5, p. 81–98, 2010.

SOOTDLEY, P. DIRCKX, P. **Biofilm formation in 3 steps**. Montana State University: Bozeman, Center for Biofilm Engineering, 2003.

SOUSA, P.M.; GOULART, F.R.V.; MARQUES, J.M.; BIZZO, H.R.; BLANK, A.F.; GROPOSO, C.; SOUSA, M.P.; VÓLARO, V.; ALVIANO, C.S.; MORENO, D.S.A.; SELDIN, L. Growth inhibition of sulfate-reducing bacteria in produced water from the petroleum industry using essential oils. **Molecules**, v. 22, n. 648, p. 1-10, 2017.

SOUSSI, A.; FERJANI, R.; MARASCO, R.; GUESMI, A.; CHERIF, H.; ROLLI, E.; MAPELLI, F.; OUZARI, H.I.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1, p. 357-370, 2016.

SPATAFORA, J.W.; BUSHLEY, K.E. Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 26, p. 37-44, 2015.

STEWART, P.S. Diffusion in biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 5, p. 1485-1491, 2003.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N.A.; DURAIPANDIYAN, V. Biological properties of endophytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-7, 2016.

SZKLARSKA-SMIALOWSKA, Z. Pitting corrosion of aluminum. **Corrosion Science**, v. 41, n. 9, p. 1743-1767, 1999.

TAHERZADEH, D.; PICIOREANU, C.; HORN, H. Mass transfer enhancement in moving biofilm structures. **Biophysical Journal**, v. 102, p. 1483-1492, 2012.

UMIKALSOM, M.S.; ARIFF, A.B.; HASSAN, M.A. Kinetics of cellulose production by *Chaetomium globosum* at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 491–498, 1998.

USHER, K.M.; KAKSONENA, A.H.; COLEB, D.M. Critical review: microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. **Journal International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 84-106, 2014.

VIANA, M.G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 152 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio

Grande do Norte, Natal, 2009.

VIANA, M.G.; LUTTERBACH, M.T.S.; SILVA, D.J.; ALBUQUERQUE, C.C.; SANTOS, F.J.N.; SANTOS, E.S. Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on *Clostridium bifermentans* and fungal-containing biofilms. **Microbiology Open**, v. x, n. x, p. x-x, 2017.

VIANA, M.G.; LUTTERBACH, M.T.S.; ALBUQUERQUE, C.C.; SILVA, D.J.; DINIZ, J.C.; TEIXEIRA, E.R.F.; SANTOS, F.J.N.; SANTOS, E.S. Antibiofilm activity and biocorrosion control by means of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) microemulsion system. **Materials Chemistry and Physics**, v. x, n. x, p. x-x, 2017.

VIANA, M.G.; ALBUQUERQUE, C.C.; SANTOS, E.S.; BEZERRA, J.D.P.; SOUZA-MOTTA. *Achaetomium lippiae*, New species of *Lippia gracilis* Schauer. **Fungal Planet**, v. x, n. x, p. x-x, 2017.

VIANA, M.G.; SANTOS, E.S.; SILVA, G.P.; SANTOS, F.J.; SILVA, A.G.; ALBUQUERQUE, C.C.; LUTTERBACH, M.T.S. Inibição da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020 mediada pela ação de metabólitos de endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer (Verbeneaceae). Revista sugerida: **Corrosion Science**.

VIANA, M.G.; SANTOS, E.S.; ALBUQUERQUE, C.C.; BEZERRA, J.D.P.; SILVA, A.G.; ANDRADE, V.S. Atividade biocida e *antibiofouling* de metabólitos de endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer sobre microrganismos em biofilme envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI) – Revista Sugerida: **Symbiosis**.

VIDELA, H.A. Prevention and controlo f biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, n. 4, p. 259-270, 2002.

VIDELA, H.A. **Biocorrosão, biofouling e biodegradação de materiais**. 1ª ed. São Paulo: Edgard blucher, 2003.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J.S.; LOOSDRECHT, M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 1, p. 1-13, 2003.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. **Bioelectrochemistry**, v. 110, p. 52-58, 2016.

XU, Y.; HE, H.; SCHULZ, S.; LIU, X.; FUSEYANI, N.; XIONG, H.; XIAO, X.; QIAN, P-Y. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1331-1336, 2010.

YU, H. ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by

- endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 437-449, 2010.
- ZARASVAND, K.A.; RAI, V.R. Microorganisms: induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 66-74, 2014.
- ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 5, p. 440-448, 2006.
- ZHAO, L.; MENG, K.; BAI, Y.; SHI, P.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; YANG, P.; SONG, W.; YAO, B. Two family 11 xylanases from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 28, p. 6880–6889, 2013.
- ZHAO, W.; WANG, X. Antifouling based on biocides: from toxic to green. In: **Antifouling Surfaces and Materials**. 1ª ed. Springer: Berlin, p. 105-134, 2015.
- ZUO, R. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 6, p. 1245-1253, 2007.
- YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, p. 59–66, 1999.
- WADE, S.A.; JAVED, M.A.; PALOMBO, E.A.; ARTHUR, S.L.; STODDART, P.R. On the need for more realistic experimental conditions in laboratory-based microbiologically influenced corrosion testing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 121, p. 97-106, 2017.
- WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M.; BHOLE, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001.
- WANG, J.; LI, Q.; LI, M-M.; CHEN, T-H.; ZHOU, Y-F.; YUE, Z-B. Competitive adsorption of heavy metal by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sulfate reducing bacteria. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 374-376, 2014a.
- WANG, X.W.; HOUBRAKEN, J.; GROENEWALD, J.Z.; MEIJER, M.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K.F.; CROUS, P.W.; SAMSON, R.A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *chaetomium*-like fungi from indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 84, p. 145–224, 2016.
- WANG, X.W.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; LI, J.; VIDEIRA, S.I.R.; SAMSON, R.A.; LIU, X.Z.; CROUS, P.W. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. **Persoonia**, v. 36, p. 83–133, 2016.
- WATERMAN, C.; CALCUL, L.; MUTKA, T.; KYLEB, D.E.; PEARCE, C.J.;

BAKER, B.J. A potent antimalarial trichothecene from hyphomycete species. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 29, p. 3989-3991, 2014.

WHO – World Health Organization. **World Health Statistics 2010**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2010.

WINDT, W.; BOON, N.; SICILIANO, S.D.; VERSTRAETE, W. Cell density related H₂ consumption in relation to anoxic Fe(0) corrosion and precipitation of corrosion products by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 1192–1202, 2003.

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological functions of secondary metabolites. In: Annual Plant Reviews, v. 40: **Biochemistry of plant secondary metabolism**. 2^a ed. Oxford: Wiley-Blackwell, UK. 2010.

WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. 1^a ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

WOOD, T.K.; HONG, S.H.; MA, Q. Engineering biofilm formation and dispersal. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 87-94, 2011.

WU, L-S.; JIA, M.; CHEN, L.; ZHU, B.; DONG, H-X.; SI, J-P.; PENG, W.; HAN, T. Cytotoxic and antifungal constituents isolated from the metabolites of endophytic fungus DO14 from *Dendrobium officinale*. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2016.

6. Artigos derivados da tese:

Os resultados derivados como produção dessa tese estão estruturados como propostas de artigos científicos (submetidos e não submetidos), mostrando detalhadamente as metodologias adotadas em cada etapa, como anteriormente descritas na metodologia experimental. Os artigos submetidos estão em língua inglesa, atendendo as exigências de cada periódico. Já os que não foram submetidos estão em língua portuguesa.

A tabela abaixo mostra a divisão desses artigos a partir de cada objetivo proposto:

Tabela 1: Estruturação dos artigos a partir dos objetivos propostos e metodologias adotadas.

Bioproduto	Objetivo	Metodologia	Artigo proposto
---	Identificação dos microrganismos endofíticos	Isolamento dos endofíticos da folha e raiz de <i>L. gracilis</i> Schauer	Artigo I: Submetido Períodico: <i>Fungal Planet – Persoonia.</i>
Metabólitos dos endofíticos	Avaliação da atividade anticorrosiva	Ensaio eletroquímico e gravimétrico	Artigo II: Não submetido
	Avaliação da atividade biocida	Relações espectrofotométricas, NMP, <i>pour plate</i> , microgravias eletrônicas.	Artigo III: Não submetido
Óleo essencial (in natura)	Avaliação da atividade biocida sobre <i>C. bifermentans</i> e fungos em biofilme / Atividade anticorrosiva	Relações espectrofotométricas, NMP, <i>pour plate</i> , micrografias eletrônicas / Ensaio eletroquímico e gravimétrico.	Artigo IV: Submetido Períodico: <i>MicrobiologyOpen</i>
Óleo essencial (microemulsão)	Avaliação da atividade biocida e anticorrosiva	NMP, <i>pour plate</i> , micrografias eletrônicas / Ensaio eletroquímico e gravimétrico.	Artigo V: Submetido Períodico: <i>Materials Chemistry and Physics</i>

6.1. Manuscrito I: Submetido à *Fungal Planet* – *Persoonia*.

www.fungalplanet.org/content/submit_species.htm



All submissions are to be sent to the CBS at p.crous@cbs.knaw.nl, from where they will be distributed to the other editors. Each new description should be prepared in MS word, and pasted into a technical template, which can be downloaded [here](#). Additional information, (text, phylogenetic trees, DNA sequence, etc.) will be pasted in MycoBank (linked to the species via its unique identifier), and needs to be submitted on separate page(s). Alignments should be deposited in TreeBASE, and sequences in GenBank and MycoBank. Wherever possible, DNA should be deposited in a DNA-Bank. Specimens should be deposited in herbaria, with preference to those which are searchable online. Cultures should be deposited in at least one major international culture collection. Because illustrations (including an ecological site photo) should be of high quality, they may, because of their size, be difficult to submit via normal e-mail. Hence we recommend electronic submission of such illustrations to p.crous@cbs.knaw.nl via www.wetransfer.com or [dropbox](#).

Overview of weblinks

- [Pedro Crous, p.crous@cbs.knaw.nl](mailto:p.crous@cbs.knaw.nl)
- [technical template, ready for use](#)
- [example of a completed technical template](#)
- [website for electronic submission of illustrations: www.wetransfer.com](http://www.wetransfer.com)
- [TreeBASE](#)
- [GenBank](#)
- [Mycobank](#)

Email de submissão encaminhado ao editor Pedro Crous:

From: Jadson Bezerra <jadsondpb@gmail.com>

Date: Tuesday, 25 July 2017 at 14:44

To: Pedro Crous <p.crous@westerdijkinstituut.nl>

Subject: New species description - FPlanet

Dear Pedro,

How are you?

Please consider this new species description for the next *Fungal Planet* description sheets.

We are working on the description of the other new species. We will send it for you until July 31th.

If you need anything more, please let me know.

Dank je wel.

Best regards, Jadson

Dr. Jadson Bezerra

Biólogo / Biologist - CRBio 92.852/05-D

CV: <http://lattes.cnpq.br/0790054254083889>

Micoteca URM / URM Culture Collection

Fungal Planet XXX – X July 2017.

Achaetomium lippiae M.G. Viana, C.C. Albuquerque, E.S. Santos, J.D.P. Bezerra & Souza-Motta, *sp. nov.*

Etymology. Name refers to the host plant, *Lippia*, from which this fungus was isolated as endophyte.

Classification — *Chaetomiaceae*, *Sordariales*, *Sordariomycetes*.

Mycelium subhyaline, septate, 2–3 μm wide hyphae. *Ascomata* superficial and immersed in culture, gregarious or solitary, ostiolate, brown to dark brown, globose to subglobose, 122–159(–256) \times 101.5–143(–212) μm . *Ascomatal wall* brown, *textura intricata* or *epidermoidea* in surface view. *Terminal* or *lateral hairs* not observed. *Asci* fasciculate, cylindrical to subcylindrical, 8-spored, soon evanescent, 35–60 \times 8–9.5 μm , short-stipitate, without apical structures. *Paraphyses* and *periphyses* not observed. *Ascospores* 1-celled, brown to dark brown, limoniform, 10–16 \times 5.5–6.5(–8) μm . *Chlamydospores* brown, globose to subglobose, terminal and intercalary, 10.5–14.5 \times 8 μm . Asexual morph not observed.

Culture characteristics — Colonies covering Petri dishes after 2 wk at 25 °C. On PDA, colonies with cream to yellowish (light straw) floccose aerial mycelium, reverse straw with centre fawn. On MEA, colonies are similar to PDA with reverse straw to amber. On WA, colonies with sparse growth and whitish mycelium, reverse uncoloured.

Typus. BRAZIL, Rio Grande do Norte state, Mossoró municipality, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (5°22'43.85''S and 37°30'12.25''W), as endophyte from *Lippia gracilis* (*Verbenaceae*), March 2015, M.G. Viana (holotype URM 90067, culture ex-type URM 7547, ITS sequence GenBank **XXXX**, LSU sequence GenBank **XXXX**, *tub2* sequence GenBank **XXXX**, MycoBank MB 820711).

Notes — Based on megablast search in GenBank, ITS sequence of the *Ach. lippiae* has 98% of identity to *Ach. luteum* (CBS 618.68; GenBank KX976571.1), 96% to *Ach. macrosporium* (CBS 152.97; GenBank KX976573.1), and 95% of identity to *Ach. strumarium*

(CBS 333.67; GenBank NR_144811.1), amongst others. On LSU sequence, *Ach. lippiae* is 99% (792/797) similar to *A. strumarium* (CBS 333.67; GenBank AY681170.1), amongst others. The *tub2* sequence has 95% (400/423) of identity to *Ach. luteum* (CBS 618.68; GenBank KX976912.1), 89% (377/423) to *Ach. macrosporum* (CBS 152.97; GenBank KX976914.1), and 86% (420/487) to *Ach. strumarium* (CBS 333.67; GenBank AY681238.1). Morphologically, *Ach. lippiae* is different from *Ach. strumarium* in size of the ascomata ((120–)160–300 μm vs. 122–159(–256) \times 101.5–143(–212) in *A. lippiae*), ascomatal hairs (3 μm vs. absent in *Ach. lippiae*), asci (48–78 \times 7–11 μm vs. 35–60 \times 8–9.5 μm in *Ach. lippiae*), ascospores ((10–)11–13(–13.5) \times 6–7.5 μm vs. 10–16 \times 5.5–6.5(–8) μm in *A. lippiae*), and chlamydospores (absent vs. present in *Ach. lippiae*) (Cannon 1986). *Achaetomium lippiae* also differ from *Ach. luteum* in ascomata size (116.2–182.6 \times 99.6–157.7 μm), asci (37–40.7 μm), and ascospores (8.8–10.3 \times 3.7–6.6 μm) (Rai *et al.* 1964); and from *Ach. macrosporum* in ascomata size (140–290 \times 110–210 μm), asci (55–80 \times 12–19 μm), and ascospores (16.5–21.5 \times 10–13.5 μm) (Cannon 1986). In the phylogenetic analyses *Ach. lippiae* is closely related to *Ach. luteum*.

Marcelino G. Viana, Everaldo S. Santos, Departamento de Engenharia Química, Campus Universitário Lagoa Nova, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;
email: bergvianna@hotmail.com, everaldo@eq.ufrn.br

Cynthia C. Albuquerque, Departamento de Ciências Biológicas, Campus Universitário Central, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, Brazil; email: cycavalcanti@gmail.com

Jadson D. P. Bezerra, Cristina M. Souza-Motta, Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: jadsondpb@gmail.com,
cristina.motta@ufpe.br

Tree legend

Maximum likelihood tree obtained by phylogenetic analyses of the combined ITS and LSU

rDNA and *tub2* sequences. Bootstrap support values from Maximum Parsimony and Maximum Likelihood, and Bayesian posterior probabilities, respectively, are indicated at the nodes. The new species is indicated in **bold** face. *Chaetomium globosum* (CBS 160.62) was used as outgroup.

Acknowledgments

J.D.P. Bezerra and C.M. Souza-Motta acknowledges financial support and scholarships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

References

- Cannon PF 1986. A revision of *Achaetomium*, *Achaetomiella* and *Subramaniula*, and some similar species of *Chaetomium*. Transactions of the British Mycological Society 87: 45–76.
- Rai JN, Tewari JP, Mukerji KG (1964). *Achaetomium*, a new genus of ascomycetes. Canadian Journal of Botany 42: 693–697.

Colour illustrations:



Figure 1: *Lippia gracilis* Schauer in the Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, host specie of *Achaetomium lippae*.

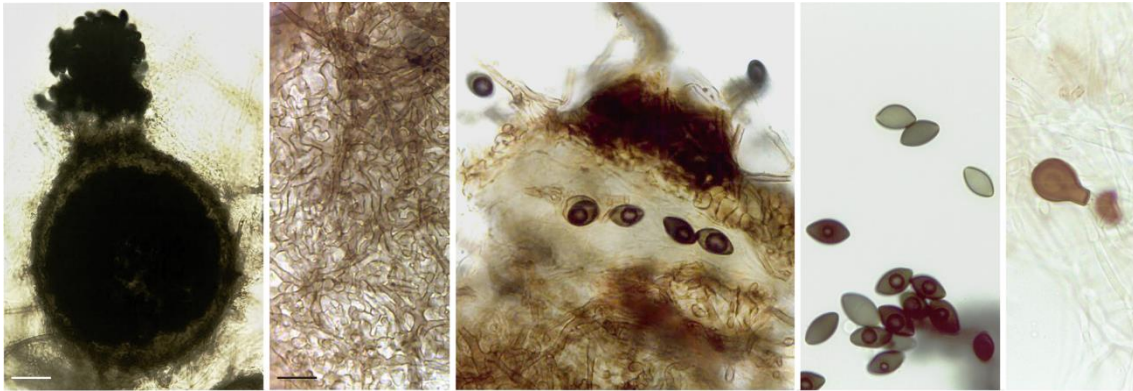


Figure 2: Ascomata, ascomatal wall, asci, ascospores, and chlamydospores. Scale bars = 10 μm .

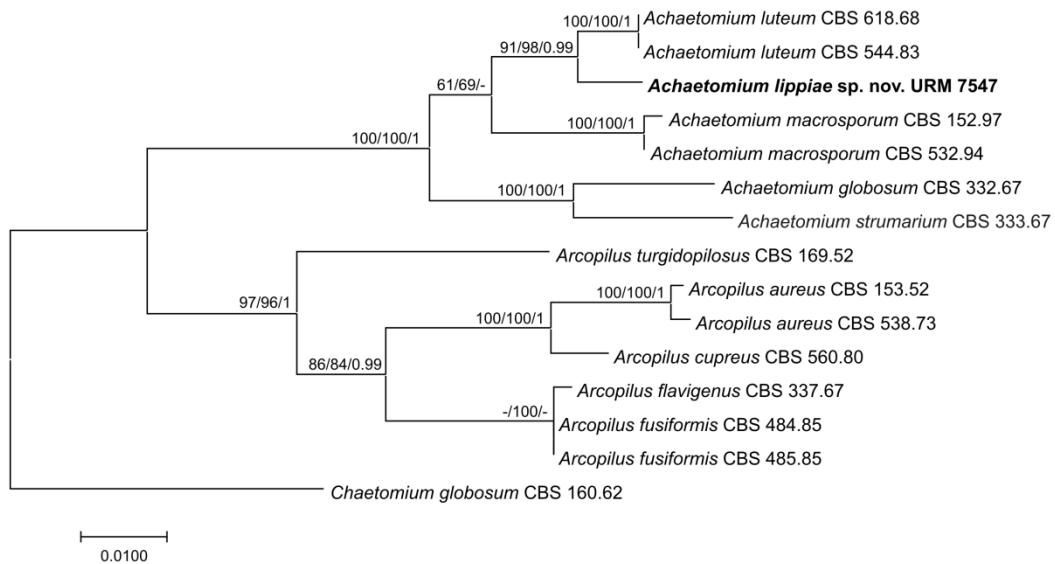


Figure 3: Phylogenetic analyses: *Ach. lippiae* is closely related to *Ach. luteum*.

6.2. Manuscrito II:

Inibição da corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020 mediada pela ação de metabólitos de endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer (Verbeneaceae)

Marcelino Gevilbergue Viana¹, Everaldo Silvino dos Santos^{1*}, Gecílio Pereira da Silva², Francisco Josiel dos Santos², Antônio Gilberto da Silva³, Cynthia Cavalcanti de Albuquerque⁴, Márcia Tereza Soares Lutterbach⁵.

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, Departamento de Engenharia Química – DEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Natal – RN, Brasil.

²Laboratório de Química Aplicada – LQA, Departamento de Agrotecnologia e Ciências Sociais – DACS, Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA. Mossoró – RN, Brasil.

³Laboratório de Ressonância Magnética – LRM, Departamento de Química – DQ, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR. São Carlos – SP, Brasil.

⁴Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – LCTV, Departamento de Ciências Biológicas – DCB, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN. Mossoró – RN, Brasil.

⁵Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação – LABIO, Instituto Nacional de Tecnologia – INT, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Resumo

Substâncias derivadas do metabolismo de microrganismos endofíticos possuem amplas propriedades de grande interesse biotecnológico, incluindo atividade anticorrosiva e biocida. A atividade de metabólitos obtidos de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer sobre a corrosão microbiologicamente induzida foi investigada por técnicas eletroquímicas e gravimétricas. Os endofíticos foram isolados das raízes e folhas de *L. gracilis* Schauer, sendo identificados como *Sordaria tomento-alba*, *Achaetomium* sp. e *Clostridium* sp. Os resultados obtidos em ambos os experimentos em meio salino a 0,5 M, com e sem biofilmes de *Desulfovibrio vulgaris* e *Gallionella* sp, demonstraram comportamentos diferenciados da atividade anticorrosiva dos metabólitos dos endofíticos de *L. gracilis* Schauer sobre aço carbono 1020 AISI a partir das técnicas eletroquímicas e gravimétricas, diferenciando-os do controle. De forma geral o metabólito do fungo *Sordaria tomento-alba* (LGS-Ff1) demonstrou maior ação anticorrosiva em ambos os experimentos, diferindo significativamente do controle, além de ter propriedades *antifouling*.

Palavras-chave: metabólitos, endofíticos, *L. gracilis* Schauer, *Sordaria tomento-alba*, anticorrosão.

1. Introdução

Microrganismos endofíticos são reconhecidos na produção de diferentes tipos de substâncias químicas com ampla potencialidade, principalmente na formulação de fármacos com atividade antimicrobiana (Yu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017), antiparasitária (Wiyakrutta *et al.*, 2004) e antitumoral (Wang *et al.*, 2000). A relevância dessas propriedades presentes nas substâncias derivadas do metabolismo microbiano é estímulo para o aumento na prospecção de endofíticos de diferentes ecossistemas no mundo, principalmente naqueles de maior pressão evolutiva, os que possuem condições ambientais consideradas mais extremas e favoráveis a esse processo (Ricklefs, 2011), como o caso no Brasil do bioma Caatinga, único no mundo e caracterizado por altas temperaturas, baixa umidade e pouca pluviosidade ao longo do ano (Andrade & Lima, 1999; Brasil, 2005).

As espécies de plantas da Caatinga são bem adaptadas ao clima semiárido da região, apresentando alterações morfológicas e comportamentais compatíveis à sobrevivência e ao sucesso reprodutivo diante das condições ambientais vigentes no bioma (Baldauf *et al.*, 2015). Essas peculiaridades adaptativas são também impostas direta ou indiretamente aos endofíticos dessas espécies, podendo repercutir, diante dos fatores de pressão adaptativa, em novas propriedades presentes nos seus metabólitos, que podem ser utilizados não apenas para fins destinados à saúde, mas com novas potencialidades úteis para os diferentes setores industriais (Corrêa *et al.*, 2014).

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI), ou biocorrosão, atinge diferentes setores industriais e demanda gastos para prevenção e controle. Apenas na indústria de petróleo e gás esse tipo de corrosão, que se apresenta principalmente na forma de pite (Xu *et al.*, 2014), atinge praticamente todas as etapas de produção e representa 10% do total dos casos dos processos corrosivos existentes, chegando a demanda de 1 a 5% do PIB para investimentos anuais em manutenção e reparos pontuais nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (Skovhus *et al.*, 2017). Microrganismos com diferentes vias metabólicas pertencentes a grandes grupos bacterianos, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e oxidantes de ferro (BOF), são considerados mediadores simbiotes das principais reações que aceleram rapidamente o processo corrosivo, provocando na sua grande maioria a corrosão localizada em forma de pites (Videla & Herrera, 2006; Chen *et al.*, 2015; Díaz-Tena *et al.*, 2016).

O expressivo aumento dos casos de corrosão microbiológica na indústria de petróleo e

gás em todo o setor produtivo dar-se, principalmente, pelo uso frequente de materiais mais baratos em tubulações e dutos, como é o caso do aço carbono, que é mais sensível à corrosão quando comparado ao aço inoxidável (Gentil, 2011); aos casos recorrentes de resistência microbiana ao uso de biocidas químicos (Blanco *et al.*, 1996), devido à ampla possibilidade de recombinação genética dentro da comunidade, bem como pela as modificações estruturais, bioquímicas e genéticas geradas pelo processo de *quorum-sensing* (Choudhary & Dannert, 2010; Batmanghelich *et al.*, 2017) que refletem também na ineficiência das substâncias químicas habitualmente utilizadas.

Produtos naturais são considerados relevantes no controle da CMI diante de suas características de baixa toxicidade ambiental (Demain, 2014), ação efetiva sob diferentes tipos de microrganismos, baixo custo de produção, fácil obtenção e aplicabilidade (Bhattacharya, 2016), além de proporcionar interferência direta no mecanismo de *quorum-sensing* do biofilme e reduzir significativamente a taxa de corrosão em diferentes tipos de materiais, principalmente nos considerados mais sensíveis ao processo corrosivo (Raja & Sethuraman, 2008; Fletcher *et al.*, 2014).

Substâncias derivadas do metabolismo microbiano representam atualmente um cenário novo de opções para o controle da CMI. Microrganismos que vivem em associação com algas marinhas já são amplamente pesquisados para esses fins (Mathan *et al.*, 2013), porém o uso de metabólitos derivados de microrganismos endofíticos para controle da CMI é algo praticamente inédito, principalmente aqueles obtidos de espécies do bioma Caatinga. O gênero *Lippia* da família *Verbeneaceae* possui cerca de 200 espécies com ampla distribuição na América do Sul, África e América Central. Suas espécies são conhecidas na produção de óleos essenciais com atividades medicinais de uso tradicional, principalmente antimicrobiana (Hernández *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Sarrazin *et al.*, 2012). *Lippia gracilis* Schauer, também conhecida como “alecrim-da-chapada”, é um subarbusto pouco ramificado com ampla distribuição no Nordeste brasileiro. Possui atividade antimalarial (Melo *et al.*, 2013) e forte ação antimicrobiana atribuída ao seu óleo essencial (Pascual *et al.*, 2001; Albuquerque *et al.*, 2006).

Várias espécies de endofíticos já foram identificadas presentes no gênero *Lippia* (Silva *et al.*, 2013), algumas produzindo metabólitos com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (Siqueira *et al.*, 2011). Entretanto, a atividade desses metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer ainda não foi avaliada sobre a CMI. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação *antibiofouling* de metabólitos de microrganismos endofíticos de

L. gracilis Schauer e sua atividade sobre a corrosão do aço carbono AISI 1020, com e sem a presença de biofilmes microbianos de *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC) e *Gallionella* sp. (ATCC), através das técnicas de impedância e polarização eletroquímica, teste gravimétrico de perda de massa, quantificação do número de pites e análises do estado da superfície do material por micrografias eletrônicas de varredura (MEVs).

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e Identificação de *L. gracilis* Schauer

Amostras de *L. gracilis* Schauer foram coletadas em fragmentos do bioma Caatinga (5°22'43.85''Sul – 37°30'12.25''Oeste) a 150m do nível do mar, localizado na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte – Brasil. A identificação da espécie foi realizada pelo biólogo taxonomista José Iranildo Miranda de Melo, pesquisador da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, e um exemplar depositado em exsicata no herbário “Dárdano de Andrade” da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) com o respectivo número de tombo: 12514. As raízes e folhas de *L. gracilis* Schauer foram coletadas de dois indivíduos na mesma área, posteriormente separadas, pesadas e mantidas em sacos de papel para isolamento dos microrganismos endofíticos.

2.2. Isolamento e conservação dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer

O material vegetal foi inicialmente processado após 24 horas da coleta. O isolamento foi feito a partir de testes de presença e ausência como também ensaios quantitativos, seguindo a metodologia de Melo & Azevedo (1998). Para a primeira avaliação as folhas e raízes de *L. gracilis* Schauer foram coletadas e separadas, retirando-se fragmentos com cerca de 10 cm² de cada parte vegetal. Os fragmentos foram desinfestados para a retirada dos microrganismos epífitos, sendo lavados inicialmente com etanol a 70% (por 5 minutos), em seguida com hipoclorito de sódio a 3% (por 10 minutos) e novamente tratados com etanol a 70% (por 5 minutos). Por fim, foram lavados com água esterilizada deionizada durante cinco minutos para retirada do excesso e alíquotas de 50 µL da última lavagem foram retiradas e depositadas em meio de cultura para controle da assepsia.

Para o isolamento dos fungos endofíticos o material vegetal desinfestado foi cortado em fragmentos pequenos de 01 cm² e distribuídos na superfície dos meios sólidos BDA (batata-dextrose-ágar) e Vogel (Vogel *et al.*, 1964) contendo 50 µg/mL do antibiótico ampicilina. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C até o crescimento dos fungos serem

visíveis. Uma porção de cada micélio morfológicamente distinto, que cresceu dos segmentos das plantas durante o período de incubação, foi retirada e transferida para placas contendo meio BDA sem antibiótico para purificação do isolado. Os isolados de cada fungo foram armazenados em meio sólido BDA inclinado a 4° C, em microtubos contendo água destilada a 4° C e em glicerol (30%) a -70° C, sendo encaminhados à identificação taxonômica.

O isolamento das bactérias endofíticas seguiu a metodologia de Lodewyckx *et al.* (2010). Macerou-se cerca de 1g das amostras vegetais desinfetadas em 09 mL de solução salina (0.85%) estéril. A suspensão obtida foi diluída serialmente e alíquotas de 0.1 mL de cada diluição plaqueada em meio sólido TSA (*Ágar-Triptona de Soja*) contendo 50 µg/mL do antifúngico benomil. As placas inoculadas foram mantidas a 28°C em estufa bacteriológica por até 10 dias, sendo o crescimento acompanhado diariamente. Após, o completo crescimento bacteriano a taxa de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinada. Por fim, a densidade da população de bactérias endofíticas foi estimada pelo peso fresco de cada parte vegetal e pelo fator de diluição. As diferentes colônias crescidas foram repicadas e transferidas para meio TSA sem antifúngico para purificação do isolado. As bactérias isoladas foram armazenadas em meio sólido TSA inclinado a 4° C e em glicerol 30% a -80° C, para posterior identificação taxonômica por métodos biomoleculares.

2.3. Identificação dos endofíticos

2.3.1. Identificação dos fungos endofíticos

Para uma análise morfológica prévia os fungos endofíticos foram cultivados em meio de cultura em ágar extrato de malte (AEM) e batata dextrose agar (BDA), sendo mantidos à 25 °C por ciclo de fotoperíodo. A extração do DNA foi realizada utilizando kit de purificação Wizard® Genomic DNA (Promega, USA) seguindo as orientações do fabricante. Para amplificação de parte dos genes LSU rDNA, ITS nrDNA, *tef1* e *tub2* foram usados *primers* LR0R e LR5 (Vilgalys & Hester, 1990); ITS5 e ITS4 (White *et al.* 1990); EF3Fd (Groenewald *et al.* 2013) e EF1-2218R (www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf); Bt2a e Bt2b (Glass & Donaldson, 1995), respectivamente. A amplificação do DNA (PCR), o sequenciamento e a análise genética das sequências foram realizados seguindo a metodologia descrita por Bezzera *et al.* (2017a e b).

2.3.2. Identificação bacteriana

O sequenciamento da subunidade 16S rRNA foi realizada e comparada de DNA. A

identificação biomolecular das cepas isoladas foi realizada a partir do sequenciamento do gene da subunidade 16S de RNA ribossomal e posterior comparação com o banco de dados de seqüências de DNA e proteínas, Genbank, (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A extração de DNA dos cultivos bacterianos foi realizada com uso do kit MOBio UltraClean Microbial DNA®, conforme as instruções do fabricante. O DNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% e marcação com SYBR Safe®. A partir do DNA obtido após a etapa de extração, o gene de RNA 16S (1500pb) foi amplificado através de PCR utilizando os primers universais para bactérias, SAdir (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') e S17rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Applied Biosystems). As condições de termociclagem foram: um ciclo inicial de desnaturação (94°C por 5 minutos); 30 ciclos intermediários de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) e um ciclo de extensão final (72°C por 5 minutos).

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% com marcação por SYBR Safe e purificados com o kit UltraClean® PCR Clean-up® (MOBio). Após purificação, a quantidade e a pureza dos produtos de PCR foram determinadas por densidade ótica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific). Os produtos de PCR foram enviados para o sequenciamento, realizado pelo Setor de Sequenciamento de DNA (Centro de Estudos do Genoma Humano – USP), em seqüenciador automático MEGABACE 1000.

Os resultados do seqüenciamento foram verificados com a ajuda do programa Chromas Lite, versão 2.01 (McCarthy, 1996 – www.technelysium.com.au). As seqüências de DNA obtidas foram comparadas às seqüências depositadas no banco de dados de seqüências de DNA e proteínas, Genbank, (www.ncbi.nlm.nih.gov). As similaridades entre as seqüências foram analisadas pelo programa BLASTn (Basic Alignment Search Tool).

2.4. Crescimento dos microrganismos endofíticos em biorreator e obtenção dos metabólitos

Os microrganismos endofíticos mais prevalentes nas amostras dos isolados das folhas e raízes de *L. gracilis* Schauer foram conservados e mantidos em coleção microbiológica. De cada fungo foi retirado pequenos discos miceliais de 6 mm de diâmetro, postos em contato com 500 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) com pH a 4.5 em

Erlenmeyers e submetidos à agitação de 50 rpm em aparelho *shaker* por dez dias a 35° C para a produção do caldo fermentado. Já para as bactérias cada cepa pura obtida foi repicada para meio caldo nutriente com pH 7.0, ajustado o inóculo a 0.5 na escala McFarland (1.5×10^8 UFC/ml) após 48 horas de crescimento e centrifugados a 5000 rpm por cinco minutos. Os *pellets* obtidos foram depositados separadamente em 50 ml de meio caldo nutriente (pH 7.0) em *Erlenmeyers* e mantidos em agitação de 50 rpm/minuto por sete dias a 25° C em aparelho *shaker*.

Após crescimento fúngico e bacteriano em biorreator, o caldo fermentado foi homogeneizado vigorosamente, filtrado em membrana de papel (Whatman n° 1 – 0.22 μm) e centrifugado a 4.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos, filtrado e por fim liofilizados (Free Zone 4.5), sendo mantido em recipientes fechados à temperatura ambiente.

Foram obtidos quatro metabólitos: três de fungos (LGS-Ff1, LGS-Ff2 e LGS-Rf1, onde “LGS” para *Lippia gracilis* Schauer, “F”: folha; “f”: fungo e “R” para raiz) e um de bactéria (LGS-Rb1, onde “LGS” para *L. gracilis* Schauer, “R”: raiz e “b”: bactéria). A caracterização dos metabólitos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM) e por ressonância magnética (RMN) para identificação das biomoléculas presentes e definição química geral apenas para aqueles metabólitos que demonstraram possuir atividade anticorrosiva.

2.5. Ensaio de corrosão

2.5.1. Preparação dos biocupons de aço carbono AISI 1020

Os biocupons de aço carbono AISI 1020 (0.16 C; 0.63 Mn; 0.0012 P; 0.031 S; 0.012 Si; 0.01 Cu; 0.03 Cr; 0.01 Ni e o restante ferro) com dimensões de 7.0 x 2.5 cm foram inicialmente tratados para retirada dos produtos de conservação e impurezas com sucessivos polimentos com lixas de 400, 800, 1000 e 1200 graus e depois lavados com água destilada deionizada. Posteriormente foram secos, passados pelo processo de ultrasonificação (UltraCleaner 1600A® - Skymen) utilizando dicloroetileno por 15 minutos, seguido de lavagem com álcool etílico e acetona, respectivamente, e retirada do excesso com água destilada deionizada. Depois foram colocados novamente em banho ultrassom por 15 minutos seguindo o mesmo procedimento. Por fim foram cortados em forma circular, conectados a eletrodos e revestidos com resina, expondo uma área de 2,5 cm de raio ao meio.

2.5.2. Ensaios experimentais

A eficiência dos metabólitos dos endofíticos de *L. gracilis* Schauer sobre a corrosão do aço carbono 1020 AISI foi analisada em dois diferentes experimentos utilizando biocupons com e sem a presença de biofilmes microbianos, respectivamente.

2.5.2.1. Ensaio com biofilmes microbiano

Para o primeiro ensaio as cepas de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. (ATCC) foram fornecidas liofilizadas pelo Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO) do Instituto Nacional de Tecnologia – INT, localizado no Rio de Janeiro – RJ, Brasil. A reativação das cepas seguiu metodologias diferenciadas de acordo com o metabolismo típico de cada espécie, utilizando meios de cultura específicos e condições de prevalência ou não de oxigênio. A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio* sp. foi mantida em meio de cultura Postgate E (Postgate, 1984) a 35° C por três semanas em condições de anaerobiose para pleno crescimento, identificado pela presença de sulfeto. Posteriormente, cerca de 1.0mL foram retirados e adicionados em frascos vedados contendo Postgate E, purgados com N₂ para retirada do oxigênio. Já a bactéria oxidante de ferro, *Gallionella* sp., foi reativada em meio citrato férrico amoniacal (10g citrato férrico amoniacal; 0.5g (NH₄)₂SO₄; 0.2g CaCl₂.6H₂O; 0.5g MgSO₄.7H₂O; 0.5g NaNO₃; 0.5g K₂HPO₄/1000mL de água), a 30° C durante duas semanas em condições aeróbias, porém protegidas da luz. Após o período de crescimento de cada bactéria os inóculos foram padronizados (10⁷ células/ml) e adicionados juntamente em recipientes *Erlenmeyers* fechados contendo 150 ml de água de produção de petróleo devidamente esterilizada e com pouca quantidade de oxigênio disponível. Posteriormente, os biocupons foram inseridos em contato com os inóculos bacterianos e mantidos suspensos durante duas semanas em aparelho *shaker* (50 rpm/minuto a 35° C) para obtenção dos biofilmes microbianos.

Após a obtenção dos biofilmes os biocupons foram retirados do aparelho *shaker* e expostos ao meio corrosivo com cloreto de sódio (0.5% NaCl) adicionado com cada metabólito separadamente em célula eletroquímica. O meio corrosivo utilizado foi produzido com NaCl puro (P.A) na concentração de 0.5M e água destilada deionizada esterilizada, e os tratamentos consistiram em diferentes concentrações de cada metabólito (0, 100, 150 e 200 µg/L) avaliadas sob a corrosão em aço carbono 1020 AISI contendo biofilme por uma hora de contato. Como controle negativo da atividade anticorrosiva foi utilizada solução salina a 0.5M.

A ação de todos os metabólitos juntos (LGS-AM), na maior concentração (200 µg/L), também foi avaliada, sendo utilizada a mesma variável de tempo que o ensaio anterior. Como controle negativo foi utilizada apenas solução salina (0.5M).

2.5.2.2. Ensaio sem biofilmes microbianos

No outro ensaio, diferentemente, os biocupons foram diretamente expostos ao meio corrosivo em célula eletroquímica adicionado com cada concentração dos metabólitos separadamente, avaliando assim a influência dos metabólitos sobre a corrosão em aço carbono 1020 AISI sem a presença de biofilmes microbianos. Os tratamentos e o tempo de contato foram os mesmos do ensaio anterior.

2.5.3. Eficiência da inibição da corrosão

2.5.3.1 Ensaio eletroquímico

Os ensaios de corrosão foram realizados em célula eletroquímica convencional utilizando cloreto de sódio (NaCl) a 0.5 M como meio corrosivo e três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho o substrato de cobre revestido com as respectivas ligas, o Ag/AgCl como eletrodo de referência e platina como contra eletrodo. A eficiência da inibição da corrosão em aço carbono AISI 1020 mediada por diferentes concentrações dos metabólitos (0, 100, 150 e 200 µg/L) dos endofíticos de *L. gracilis* Schauer foi avaliada por técnicas de dinâmica de potencial usando potenciostato/galvanostato Autolab® modelo PG STATE 204 acoplado com software NOVA versão 1.11 para aquisição e tratamento dos dados.

As técnicas empregadas foram Polarização Potencialdinâmica Linear (PPL) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE). Para a obtenção das curvas de polarização foram realizadas varreduras de potencial abaixo e acima de 300 mV em relação ao potencial de circuito aberto (ECA) a uma velocidade de 01 mV/s por uma hora de imersão. As análises por espectroscopia foram feitas em potencial de circuito aberto à temperatura ambiente de 25 °C na faixa de frequência de 10000 Hz a 06 MHz. O método da extrapolação das retas de TAFEL foi utilizado para obtenção das curvas e taxas de eficiência da inibição da corrosão (IE) de acordo com a equação (1):

$$IE(\%) = \frac{I_{corr} - I_{corr}(inh)}{I_{corr}}$$

Equação 1

Onde I_{corr} e $I_{corr}(inh)$ são as correntes de densidade da corrosão do aço carbono AISI 1020

na ausência e presença de cada metabólito, respectivamente.

O fenômeno de adsorção dos metabólitos sobre a superfície do aço carbono 1020 AISI também foi calculado pela isoterma de adsorção de Langmuir, dada pela equação (2):

$$\frac{c}{\theta} = \frac{1}{K} + C \quad \text{Equação 2}$$

O ângulo de cobertura da superfície (θ) foi calculado pelas taxas de inibição da corrosão obtidas pelos dados das curvas de polarização, “C” representa a concentração de cada metabólito em $\mu\text{g/L}$ e “K” é a constante de equilíbrio de adsorção.

2.5.3.2 Testes gravimétricos

2.5.3.2.1. Ensaio de corrosão por perda de massa

Ensaio gravimétricos por perda de massa também foram realizados fora da célula eletroquímica para validar a eficiência dos tratamentos na presença e ausência de biofilmes. Os corpos de provas foram retirados dos *Erlenmeyers* logo após 72 horas de contato com cada metabólito, realizada a decapagem dos biofilmes microbianos e devidamente enxaguados com água e acetona, sendo por fim secos com jato de ar quente. Os biocupons sem biofilmes foram diretamente tratados da mesma forma. A perda de massa foi calculada pela seguinte equação (3) dada pela NACE TM-0193:

$$CR = 87,6 \frac{W}{dAt} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: CR é a taxa de corrosão, W: perda de massa (mg), d: densidade do biocupon (g/cm^3), A: área exposta do biocupon (cm^2) e “t” sendo o tempo de exposição (horas).

A densidade do aço carbono AISI 1020 foi considerada 7.86 g/cm^3 de acordo com a *NACE-International Institute*. As taxas de corrosão foram obtidas em milímetro de penetração por ano (mma), unidade que indica penetração e profundidade do ataque corrosivo. Cada experimento foi repetido três vezes sob as mesmas condições (à temperatura ambiente) e as diferenças relativas entre as replicatas foram menores do que 5%, indicando boa reprodutibilidade. A média foi obtida a partir dos valores das três replicatas e realizada análise de variância a partir dos diferentes tempos de contato com os metabólitos. Como controle positivo foi utilizado apenas o contato de cada biocupon com água destilada e como

negativo solução salina a 0.5M.

2.5.3.2.2. Análises de superfície e quantificação do número de pites

A quantificação do número de pites também foi realizada em ambos os experimentos, seguindo a metodologia empregada pela NACE – *Internt. Inst.* (2000) e Chen *et al.* (2015) através da análise por micrografias obtidas das superfícies dos biocupons com as médias do número de pites obtidas por um *software* de contagem padrão. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% ($P < 0,05$). Para a obtenção das micrografias eletrônicas os biocupons foram inicialmente lixados, em seguida lavados com água destilada, álcool (P.A) e secos em dessecador comercial. Por fim, foram imersos em solução salina a 0.5M contendo cada metabólito na concentração de 200 $\mu\text{g/L}$ por 180 minutos. Como controle foi utilizado apenas solução salina (0.5M). Após o período de contato os biocupons foram retirados do meio corrosivo, secos e obtidas as micrografias eletrônicas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Microrganismos endofíticos obtidos

Baseado na morfologia e pesquisas no GenBank (NCBI) usando diferentes sequências de DNA, foi possível identificar os isolados LGS-Ff2 e LGS-Ff3 como *Sordaria tomentoalba* Cailleux e o isolado LGS-Ff1 como *Chaetomium* sp.

A pesquisa realizada no GenBank, usando sequências da região LSU dos fungos LGS-Ff2 e LGS-Ff3, mostrou que esses isolados estão proximadamente relacionados com *Sordaria brevicollis* (FR774288; Semelhança 797/797(100%), *gaps* 0/797(0%)), *Sordaria tomentoalba* (AY681161; Semelhança 797/797(100%), *gaps* 0/797(0%)), entre outros. O sequenciamento usando sequências ITS mostrou semelhança com *Sordaria tomentoalba* (AY681195; Semelhança 540/544(99%), *gaps* 2/544(0%)), *Gelasinospora tetrasperma* (NR_077163; Semelhança 535/541(99%), *gaps* 1/541(0%)), entre outros. Sequenciamento de *tef1* também mostrou semelhança com *Sordaria tomentoalba* (FR774391; Semelhança 484/489(99%); *gaps* 0/489(0%)), *Sordaria sclerogenia* (FR774390; Semelhança 447/489(91%), *gaps* 7/489(1%)), *Sordaria brevicollis* (FR774387; Semelhança 448/491(91%), *gaps* 6/491(1%)), e baixa compatibilidade com outras espécies dos gêneros *Neurospora* e *Gelasinospora*. A partir do sequenciamento de *tub2*, os isolados LGS-Ff2 e LGS-Ff3 foram relacionados com maior proximidade à *Sordaria tomentoalba* (AY681229; Semelhança 482/496(97%), *gaps* 2/496(0%)), seguida à *Sordaria sclerogenia* (FR774341;

Semelhança 451/468(96%), *gaps* 1/468(0%)), e baixa correlação com outras espécies dos gêneros *Sordaria*, *Neurospora* e *Gelasinospora*.

Com o sequenciamento da região LSU e pesquisas no banco de dados (GenBank) o isolado LGS-Ff1 mostrou-se mais aproximado com *Chaetomium strumarium* (AY681170; Semelhança 792/797(99%), *gaps* 1/797(0%)), *Chaetomium globosum* (JX280684; Semelhança 789/797(99%), *gaps* 1/797(0%)), e com outras espécies *Chaetomium*. O sequenciamento da região ITS também demonstrou relação proximada a *Chaetomium* sp. (HQ607809; Semelhança 564/587(96%), *gaps* 8/587(1%)), *Chaetomium strumarium* (AY681204; Semelhança 562/592(95%), *gaps* 13/592(2%)) e KP941089 (semelhança 438/460(95%), *gaps* 8/460(1%)), além de outros. Com base no sequenciamento de *tef1* o isolado apresentou baixa identidade (menor que 93%) com diferentes gêneros, incluindo *Neurospora*, *Gelasinospora*, *Sordaria*, entre outros. Da mesma forma o sequenciamento de *tub2* mostrou muito baixa identidade com *Chaetomium strumarium* (AY681238; Semelhança 420/487(86%), *gaps* 7/487(1%)), com outras espécies desse gênero e com outros gêneros. A partir dessas análises o isolado LGS-Ff1 foi considerado ser uma nova espécie do gênero *Achaetomium*.

Em relação à identificação de bactérias o único gênero identificado pelo sequenciamento da região ribossomal 16S foi *Clostridium*, identificado com 99% de similaridade de acordo com o GenBank. Porém, a espécie não foi definida, sendo classificada com *Clostridium* sp., isolada de ambas as partes de *L. gracilis* Schauer e com maior prevalência na raiz (54%), considerada a principal “porta” de entrada dos microrganismos da rizosfera, futuros endofíticos (Melo & Azevedo, 1998).

A prospecção de microrganismos endofíticos do gênero *Lippia* tem sido realizada em algumas espécies, principalmente para obtenção de metabólitos com fins antimicrobianos (Malhadas *et al.*, 2017). Porém, especificamente de *L. gracilis* Schauer não há, até o presente momento, nenhum levantamento dos seus principais microrganismos endofíticos, sendo esse trabalho também relevante nesse aspecto. Diversos gêneros de bactérias e fungos endofíticos de *L. sidoides* Cham. foram isolados e devidamente identificados (Silva *et al.*, 2013), mas nenhum similar aos aqui obtidos das folhas e raiz de *L. gracilis* Schauer. As espécies *Sordaria tomento-alba*, *Achaetomium* sp e *Clostridium* sp. foram identificados nesse trabalho de forma pioneira como microrganismos endofíticos também presentes no gênero *Lippia*.

3.2. Metabólitos obtidos

Dos quatro metabólitos obtidos três destes (LGS-Ff1, LGS-Ff2 e LGS-Rb1) demonstraram possuir atividade anticorrosiva sobre aço carbono AISI 1020 pelas técnicas empregadas e apenas esses que demonstraram atividade foram caracterizados e identificados quimicamente por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM) e por ressonância magnética (RMN). O LGS-Ff1 foi obtido do fungo *Sordaria tomento-alba* e o LGS-Ff2 de *Chaetomium sp.* O LGS-Rb1 refere-se ao metabólito obtido da bactéria *Clostridium sp.*

Os resultados prévios revelaram que o metabólito LGS-Ff1 foi classificado como um ácido, com grupo funcional amina (Fig. 1a). Os ácidos, com grupo amina funcional, na sua maioria, podem apresentar propriedade antioxidante (Thomas *et al.*, 2015). Espécies do gênero *Sordaria* são utilizadas na produção de lactato a partir da obtenção de suas enzimas com atividade na redução desse ácido (Kim *et al.*, 2016), demonstrando que essas espécies possuem rotas relacionadas à metabolização e/ou produção de ácidos.

Já o metabólito obtido do fungo endofítico *Achaetomium sp.* (LGS-Ff2) foi identificado como carboximetilcelulose, de forma molecular $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (Fig. 1b), um polímero derivado da celulose, bastante solúvel em água e facilmente degradada por microrganismos (Togrul & Arslan, 2003). A utilização de microrganismos para metabolização desse carboidrato é habitualmente frequente na produção de biocombustível (Roohina *et al.*, 2016) e a obtenção de enzimas a partir de novas espécies de fungos e bactérias para esse processo constitui algo recorrente diante do crescimento da indústria de energias renováveis. Entretanto, a produção de carboidratos diretamente do metabolismo microbiano é algo restrito a algumas espécies, salvo às de endofíticos (Mahapatra & Banerjee, 2013) que podem auxiliar as plantas na sua estruturação e resistência de suas partes a partir da produção interna de carboidratos na relação complexa entre hospedeiro e endofíticos (Ryan *et al.*, 2015). O fungo *Achaetomium sp.* é comumente utilizado na produção da xilanase, de grande importância para fins industriais (Zhao *et al.*, 2013), e aqui enfocamos um novo potencial para essa espécie endofítica obtida da folha de *L. gracilis* Schauer: a produção de carboximetilcelulose, que pode ser empregado como matéria prima para diferentes setores, especialmente para a indústria de biocombustível.

O metabólito obtido da bactéria endofítica *Clostridium sp.* foi identificado como um dos tipos das cefalosporina (Fig. 1c), classe de antibióticos bastante utilizada comercialmente (Boeckel *et al.*, 2014). A produção dessa substância é comumente obtida a partir de processos fermentativos que pode utilizar diferentes tipos de microrganismos, incluindo os que habitam

o interior de algas (Silber *et al.*, 2016). As rotas metabólicas empregadas por microrganismos para a síntese de cefalosporinas utilizam carboidratos condensados com ácidos gerando a penicilina G, o precursor para as demais reações metabólicas, todas influenciadas por temperatura e pH (Luo *et al.*, 2017). Apesar de ser considerada uma espécie patogênica em algumas circunstâncias (Dapa *et al.*, 2012) e estar envolvida em casos de biocorrosão (Palaniappan & Toleti, 2016), a bactéria endofítica *Clostridium* sp. obtida da raiz de *L. gracilis*, demonstrou produzir em biorreator uma importante substância com possível propriedade antimicrobiana, principalmente sobre bactérias multirresistentes (Tang *et al.*, 2017). Fatores ambientais em que a planta hospedeira está submetida bem como ataque de patógenos e parasitas influenciam fortemente as rotas metabólicas da planta e dos seus microrganismos endofíticos, gerando subprodutos relacionados direta ou indiretamente com o tipo de resposta da planta às ações externas (Bacon *et al.*, 2016). É fato que os endofíticos respondem diretamente ao ataque de parasitas na planta a partir da produção de substâncias, geralmente com atividade antimicrobiana, principalmente obtida de bactérias (Zhou *et al.*, 2016).

3.3. Eficiência da inibição da corrosão

Os resultados obtidos em ambos os experimentos em meio salino a 0.5 M, com e sem biofilmes, demonstraram comportamentos diferenciados da atividade anticorrosiva dos metabólitos dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer a partir das técnicas aqui empregadas para o aço carbono 1020 AISI, diferenciando-os do controle. De forma geral o metabólito do fungo *Sordaria tomento-alba* (LGS-Ff1) demonstrou maior ação anticorrosiva em ambos os experimentos. Já nos ensaios avaliando a ação dos três metabólitos em associação (LGS-AM) não houve atividade significativa sobre a corrosão em aço carbono AISI, com biofilme, pelas técnicas de polarização e impedância eletroquímicas aqui empregadas, não diferindo estatisticamente do controle na concentração avaliada.

3.7.1. Ensaio com biofilmes microbiano

Nos ensaios de polarização eletroquímica a ação dos metabólitos foi diferenciada entre si e em relação ao controle em ambos os experimentos. Os parâmetros eletroquímicos obtidos das curvas de Tafel a partir da presença e ausência dos metabólitos mostraram que no ensaio com a presença de biofilmes microbianos houve nítida diferença da ação de todos os metabólitos em relação ao controle na maior concentração avaliada (200 µg/L), sendo

reduzida a densidade da corrente com o aumento do potencial eletroquímico (Tabela 1).

As curvas de polarização anódica e catódica mostram diminuição da densidade de corrente em ambos os ramos, com maior inibição no catódico (Fig. 2). Houve diminuição da corrente por ação dos metabólitos LGS-Ff1 e LGS-Rb1 em relação ao controle, tendo taxas de eficiência na inibição da corrosão (IE) de, aproximadamente, 44 e 24%, respectivamente, sendo LGS-Ff1 de maior atividade na maior concentração avaliada (200 µg/L) sobre aço carbono AISI 1020 com presença de biofilme. O metabólito LGS-Ff2 não demonstrou eficiência significativa na inibição da corrosão apesar de diminuir consideravelmente o potencial de corrosão (E_{corr}). É fato que a presença por si só de microrganismos, em biofilmes ou não, sobre a superfície de materiais reduz o E_{corr} a níveis significativos (Jack *et al.*, 1992) como pode ser observado em todos os tratamentos aqui avaliados. Há uma correlação direta entre a diminuição do potencial de corrosão com o aumento no número de microrganismos e presença de substâncias poliméricas extracelulares em biofilmes (Baeza *et al.*, 2013). Dessa forma a ausência da atividade do metabólito LGS-Ff2 pela técnica de polarização eletroquímica sobre biofilmes e sobre a consequente inibição da corrosão pode ser confirmada pela elevação na intensidade da corrente ($I_{corr} = 4,30$) e não por afetar unicamente o E_{corr} .

Dentre os metabólitos avaliados apenas o obtido de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1) agiu aumentando as constantes de Tafel anódica e catódica, sugerindo que o mecanismo de ação dessa substância, nesse ensaio, seja pela direta interação e adsorção com o biofilme na superfície do aço carbono. Entretanto, o aumento dessas constantes por si só não indica efetividade da substância na inibição da corrosão (Torres *et al.*, 2016). O LGS-Ff1 apesar de não aumentar essas constantes foi significativamente mais eficiente que o LGS-Rb1, expressados pelo valor de IE. Provavelmente o metabólito de *S. tomento-alba* tenha agido apenas destruindo o biofilme por suas propriedades de ação biocida, porém não adsorvendo completamente sobre a superfície exposta do aço após a eliminação da comunidade microbiana, como pode ter ocorrido contrariamente por ação do LGS-Rb1. Como resultado a redução na intensidade da corrente deu-se provavelmente pela eliminação da comunidade microbiana e/ou pela baixa concentração do LGS-Ff1 adsorvida à superfície. Porém, para avaliar realmente a adsorção dessas substâncias seria necessário obter nesse ensaio as isotermas de adsorção, que não foram obtidas pela ausência de variação da concentração dos metabólitos.

O LGS-Ff1, por ser quimicamente definido como um ácido, tem característica de molécula que pode ser anfótera e sua solubilidade e ionização dependem dos valores de pH e

pKa dos seus grupos aminos e carboxílico no meio, sendo preferencialmente dissolvida em substâncias também de caráter ácido (Tenjarla, 2015). Como a água de produção de petróleo é uma mistura complexa de substâncias, rica em sais e de pH relativamente ácido (Motta *et al.*, 2013) a dissolução dessa molécula no meio foi possivelmente facilitada, ampliando sua ação biocida a partir da maior interação com o biofilme microbiano. A redução do potencial de adsorção nesse caso deve-se ter ocorrido pela presença da comunidade microbiana sobre a superfície do aço carbono, já que, é reconhecido na literatura, a capacidade de adsorção dessa substância em diferentes materiais (Zadeh & Kohansal, 2012).

Nos ensaios de impedância eletroquímica a ação dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer em meio salino (0.5M) sobre aço carbono 1020 AISI com presença de biofilme microbiano também foi diferenciada entre si, apresentando diagramas variáveis. A Figura 3 mostra os diagramas de impedância eletroquímica a partir do modelo de Nyquist do aço carbono 1020 AISI em meio salino a 0.5M na presença e ausência dos metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 200µg/L. Na ausência dos metabólitos (controle) e na presença do LGS-Rb1 há formação de arcos praticamente iguais, não havendo diferença significativa de resistência de transferência de carga (Rct) (Tabela 2). Diferentemente, na presença dos metabólitos LGS-Ff1 e LGS-Ff2 há aumento da dimensão dos arcos representando aumento da Rct, o que nesse caso representa diminuição da área ativa em decorrência da adsorção da substância sobre a superfície do material, corroborando com os resultados de polarização eletroquímica e concluindo que o metabólito LGS-Rb1 não foi eficiente na redução da corrosão nesse ensaio. Porém, o LGS-Ff1 apresentou melhor eficiência quando comparado ao LGS-Ff2 (n%: 67,13 e 16,95, respectivamente) e apesar de maior eficiência de ambos em relação ao controle não houve continuidade dos arcos gerados por ação desses metabólitos na presença de biofilme, mostrando possível rompimento do filme protetor, que é gerado pela adsorção da maioria das substâncias orgânicas sobre a superfície do material ao término do tempo de contato (Mourya *et al.*, 2014; Faustin *et al.*, 2015), inibindo a corrosão.

Microrganismos isolados ou em biofilme tendem a aumentar a Rct e o ângulo da fase com o passar do tempo de permanência ou desenvolvimento da comunidade microbiana sobre a superfície de materiais (Babauta *et al.*, 2012). Aqui verificamos a partir da formação dos arcos e pela nítida diferença em relação ao controle que houve realmente ação dos metabólitos LGS-Ff1 e LGS-Ff2 sobre a inibição da corrosão mesmo na presença de biofilmes. O LGS-Ff1 reduziu a corrosão em consequência da eliminação do biofilme microbiano em

decorrência da sua possível ação antibacteriana, mesmo em baixa concentração, e o polímero carboximetilcelulose, apesar de não apresentar atividade antimicrobiana reconhecida, salvo quando modificada estruturalmente (Hashem *et al.*, 2013) ou agregada a outras substâncias (Zhong *et al.*, 2013), possui forte ação anticorrosiva comprovada principalmente devido a forte adsorção ao material, formando um filme protetor (Umoren *et al.*, 2010; Kesavan *et al.*, 2012), como discutido anteriormente.

Por outro lado o rompimento dos arcos deve-se provavelmente a ineficiência parcial da concentração utilizada nos ensaios. Concentrações maiores desses metabólitos provavelmente possam formar e manter os arcos por mais tempo, já que o aumento da concentração de carboximetilcelulose (LGS-Ff2) mostra-se influenciar a sua atividade anticorrosiva, otimizando-a (Solomon *et al.*, 2010).

Os resultados da ação dos metabólitos em associação (LGS-AM), na presença de biofilme, demonstraram não ser eficiente sobre a inibição da corrosão em aço carbono AISI 1020 na concentração avaliada (200 µg/L). Os parâmetro cinéticos obtidos a partir das curvas de polarização para aço carbono 1020 AISI em solução salina a 0.5M contendo os metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer em associação (LGS-AM) demonstraram que não houve redução da corrente com o aumento do potencial (Tabela 3). Ao contrário, o uso de LGS-AM aumentou consideravelmente a intensidade da corrente em relação ao controle, não havendo eficiência de inibição da corrosão. A Figura 4 mostra as curvas de polarização obtidas a partir do contato de LGS-AM com aço carbono AISI 1020 contendo biofilme. Não houve diferença nas constantes anódica e catódica por ação de LGS-AM, não diferindo estatisticamente do controle. Apesar da ação de metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer não ter sido ainda verificada na literatura, sabe-se que o uso de produtos naturais em associação pode ampliar a ação de inibição da corrosão (Abd-El-Nabey *et al.*, 2016). Entretanto, o uso de metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer em associação não foi eficiente na inibição da corrosão em aço carbono 1020 AISI contendo biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. na concentração de 200 µg/L e no respectivo meio avaliado (NaCl 0.5M). Possivelmente, os metabólitos quando combinados não tiveram ação biocida efetiva, o que é comum para outras substâncias naturais quando associadas (Moloney, 2016).

A Figura 5 mostra os diagramas de impedância eletroquímica a partir do modelo de Nyquist do aço carbono 1020 AISI com biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em contato com LGS-AM (200 µg/L) em meio salino a 0.5M. Houve diferença na formação dos arcos em

relação ao controle. O arco formado pela ação de LGS-AM foi menos proeminente, refletindo menor taxa de Ctd e maior de Rct (dados não mostrados), diferindo proeminente do controle e mostrando nenhuma atividade. A formação do arco deu-se, possivelmente, pela própria adesão do biofilme sobre a superfície do aço (Moradi *et al.*, 2016), sem refletir na atividade propriamente dita dos metabólitos.

3.7.2. Ensaio sem a presença de biofilmes

Em relação aos resultados de polarização obtidos no ensaio sem a presença de biofilmes microbianos de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. houve comportamento diferenciados da ação das substâncias obtidas dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer em relação ao ensaio com a presença de biofilmes sobre aço carbono AISI 1020. Entre os metabólitos avaliados o LGS-Ff1 demonstrou melhor eficiência entre todos, com diferença significativa em relação ao controle e com aumento na eficiência de inibição da corrosão.

Os parâmetros obtidos das curvas de Tafel a partir da variação da concentração dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer mostram que houve eficiência na inibição da corrosão para os metabólitos LGS-Ff1 nas concentrações de 100 e 150 μ g/L e para LGS-Ff2 no tratamento de 150 μ g/L, reduzindo a densidade da corrente com o aumento do potencial (Tabela 4). As curvas de polarização mostram diminuição da densidade de corrente em ambos os ramos, com maior inibição no catódico (Figura 6), sendo mais pronunciada que o ensaio com a presença de biofilme microbiano e, diferentemente, em uma concentração menor (150 μ g/L).

O metabólito LGS-Ff2, diferentemente do ensaio anterior, foi efetivo na redução da corrente na concentração de 150 μ g/L avaliada, alcançando cerca de 46,30% de eficiência na inibição da corrosão. De forma similar ao ensaio com biofilme o LGS-Ff1 mostrou-se eficiente, porém com diferenças nas concentrações avaliadas e com aumento na eficiência de inibição da corrosão. Foram obtidas 50,41% e, aproximadamente, 56% de eficiência nos tratamentos de 100 e 150 μ g/L, respectivamente, mas a concentração de 200 μ g/L não demonstrou atividade significativa. Em relação às constantes de Tafel o metabólito LGS-Ff1 agiu elevando unicamente a constante catódica (β_c), sugerindo que essa substância afeta a reação de evolução do hidrogênio, possivelmente por diminuição da área ativa pela adsorção das moléculas à superfície do aço carbono AISI 1020 (Abdel-Gaber, 2006). Já o metabólitos LGS-Rb1, que no ensaio anterior demonstrou atividade, não demonstrou ser eficiente para a inibição da corrosão em aço carbono AISI 1020 sem biofilme microbiano pelas técnicas aqui

empregadas, não diferindo estatisticamente do controle.

Os resultados dos ensaios de impedância da ação dos metabólitos sobre aço carbono sem biofilme justificam e reforçam, para algumas substâncias, os obtidos na polarização eletroquímica. A Figura 7 mostra os diagramas de impedância obtidos pelo modelo de Nyquist do aço carbono 1020 AISI em meio salino (NaCl 0.5M) na presença e ausência dos metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 150µg/L, com maior eficiência observada do metabólito LGS-Ff1.

Para a ação do metabólito LGS-Rb1 não houve formação de arco capacitivo proeminente, justificado pelos dados obtidos de diminuição da R_{ct} e aumento de C_{dl} (Tabela 5), não diferindo do controle. Esse resultado vai de acordo com os obtidos no ensaio de polarização e confirma a ineficiência dessa substância (grupo das cefalosporina) sobre a inibição da corrosão em aço carbono AISI 1020 sem biofilme microbiano. A ineficiência dar-se pela ausência de adsorção de LGS-Rb1 sobre a superfície do material à medida do aumento de sua concentração, comprovada pela adequação da ação ao modelo de isoterma de Langmuir ($R^2=0,98$) (Figura 8a). Quimicamente os grupos de cefalosporinas apresentam propriedades que proporcionam altos índices de adsorção em diferentes meios (Ahmed & Theydan, 2012), porém em aço carbono AISI 1020 a adsorção não foi significativa. Provavelmente a natureza química do meio de condução do ensaio tenha interferido nessa propriedade bem como as próprias características do material.

A ação da substância carboximetilcelulose (LGS-Ff2), por outro lado, agiu formando um arco capacitivo com dimensões mais ajustadas, apesar de reduzir a R_{ct} e elevar a C_{dl} , não demonstrando nenhuma eficiência (n%) (Tabela 5). O modelo de isoterma de adsorção de Langmuir não apresentou um ajuste com os dados experimentais de ação do metabólito LGS-Ff2 ($R^2=0,5258$) (Fig. 8b) nas concentrações avaliadas, revelando a ineficiência dessa substância sobre a corrosão por estar fora dos coeficientes de correlação aceitáveis para inibidores efetivos de corrosão (De Souza *et al.*, 2014). Dessa forma os resultados obtidos de impedância para atividade do LGS-Ff2 não corroboram para a eficiência efetiva demonstrada no ensaio de polarização eletroquímica, ressaltando a importância de ensaios complementares para o estudo da corrosão.

O metabólito LGS-Ff1, de forma diferenciada dos outros dois metabólitos, apresentou formação de arco bastante proeminente com aumento da resistência e mantendo-se estável durante todo o tempo do ensaio (Fig. 7). O comportamento de estabilidade do arco formado sugere que o LGS-Ff1 adsorve fortemente à superfície do aço carbono, aumentando R_{ct} e

inibindo a corrosão, com eficiência de 78,54% (Tabela 5). Os dados obtidos se adequam significativamente à isoterma de Langmuir ($R^2=0,99$) (Fig. 8c) e confirmam a propriedade de adsorção dessa substância proporcionalmente com o aumento da concentração.

A formação de arcos capacitivos proeminentes a partir da ação de substâncias orgânicas reflete a efetividade sobre o processo corrosivo. A ação desses metabólitos sobre o aço carbono AISI 1020 provavelmente proporciona a repassivação do material, estabilizando a perda de elétrons, inibindo assim o processo corrosivo (Njoku *et al.*, 2016).

3.7.3. Testes gravimétricos

3.7.3.1. Inibição da corrosão por perda de massa

A atividade inibitória do processo corrosivo por ação dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer também pôde ser verificada a partir dos resultados obtidos pelo teste gravimétrico de perda de massa nos teste com e sem a presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. sobre a superfície do aço carbono AISI 1020 (Fig. 9).

No ensaio com biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. houve variação da ação entre os metabólitos na redução da corrosão por perda de massa a partir do tratamento com 200 µg/L após 72 horas de contato (Fig. 9a). Os resultados reforçam os encontrados nos ensaios eletroquímicos, mostrando a eficiência dos metabólitos LGS-Ff1 e LGS-Ff2 na redução da corrosão por perda de massa do aço carbono AISI 1020, havendo diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0.05$).

Apesar do metabólito LGS-Rb1 agir, provavelmente, inibindo o crescimento dos microrganismos em biofilme, sua ação não se demonstrou significativa na redução da corrosão no ensaio de perda de massa nessa concentração avaliada, não diferindo do controle ao nível de 5%. E no ensaio sem a presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. a taxa de corrosão passou a ser ainda maior na mesma concentração (Fig. 9b). Porém, a eficiência do LGS-Ff1 e LGS-Ff2 foram mantidas no ensaio sem biofilme de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp., diferindo significativamente do controle e mantendo praticamente a mesma média de taxa de corrosão, abaixo de zero, em todas as concentrações avaliadas (Fig. 9b), corroborando, assim, com os parâmetros cinéticos obtidos a partir das curvas de polarização também sem biofilme (Tabela 4).

Os metabólitos aqui avaliados, LGS-Ff1 e LGS-Ff2, mostraram-se efetivos na redução da taxa de corrosão por perda de massa, diferindo da ação de outros metabólitos obtidos de microrganismos endofíticos também avaliados sob a CMI por perda de massa (Rosa *et al.*,

2016).

3.7.3.2. Análise de superfície e Inibição da corrosão por redução do número de pites

Como forma complementar desses resultados também foi verificada a capacidade dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer em reduzir o número de pites e evitar a formação de *fouling* sobre a superfície do aço carbono AISI 1020. Em ambos os ensaios anteriormente descritos, com e sem presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp., os metabólitos LGS-Ff2 e LGS-Rb1 não tiveram atividade significativa na redução do número de pites (Fig. 10), sendo LGS-Ff1 o único metabólito eficaz para essa atividade apenas nos ensaios com a presença de biofilme, com ação estatisticamente similar a do controle (Fig. 10a). A análise de superfície também revelou que o LGS-Ff1 foi o único a evitar a formação de *fouling* sobre a superfície após 180 minutos de contato (Fig. 11).

A média do número de pites presentes nas amostras do ensaio com biofilme foi substancialmente maior em relação a aquela na ausência da comunidade microbiana, chegando a duplicar, praticamente. Esse resultado já era esperado tendo em vista que a presença de pites é efeito direto da corrosão localizada provocada por microrganismos, principalmente por BRS, e também a caracteriza (Enning & Garrelfs, 2014).

Diferentes produtos naturais demonstraram agir reduzindo a corrosão por perda de massa e diminuir o número de pites, seja inibindo diretamente o crescimento microbiano, eliminando assim os indutores, ou na própria corrosão inorgânica, através das alterações nas reações de oxi-redução do material, como, por exemplo, do aço carbono (Noor *et al.*, 2016; Ituen *et al.*, 2017). Entretanto, a utilização de metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer, para esse fim, ainda não há na literatura, sendo nosso trabalho pioneiro nesse aspecto e demonstrando ação efetiva pelos ensaios gravimétricos.

Ensaio gravimétricos por si só não são significativos para comprovar a eficiência de determinadas substâncias na inibição da corrosão (Lukovits *et al.*, 2001). Contudo, as técnicas aqui empregadas reforçaram bem os resultados das técnicas mais apuradas de polarização e impedância eletroquímica, mostrando a efetividade dos metabólitos LGS-Ff1 e LGS-Ff2 como inibidores da corrosão microbiologicamente induzida.

4. Conclusões

Os principais microrganismos endofíticos isolados das folhas e raiz de *L. gracilis* Schauer foram *Sordaria tomentoalba*, *Achaetomium* sp e *Clostridium* sp., com maior

prevalência de microrganismos obtidos da folha. Foram avaliados três metabólitos, sendo o obtido de *S. tomentoalba* (LGS-Ff1) o que demonstrou maior atividade anticorrosiva sobre aço carbono AISI 1020, com e sem biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp., pela técnicas eletroquímica e gravimétricas. A atividade *antifouling* também foi exclusiva do LGS-Ff1, sendo validada pela análise de superfície do aço carbono AISI 1020.

A prospecção de metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer podem representar novas potencialidades para a prevenção e controle do corrosão microbiologicamente induzida no cenário do uso de biocida naturais ambientalmente amigáveis. Assim, nesse contexto, o metabólito de *S. tomento-alba* merece maior destaque pelos resultados de inibição da corrosão em aço carbono AISI 1020 aqui demonstrados.

5. Referências

Abd-El-Nabey, B.A.; El-Housseiny, S.; El-Naggar, G.A.; Matter, E.A.; Esmail, G. Green inhibitors for the acidic corrosion of steel. *Physical Chemistry*, 6 (2016) 57-66. doi:10.5923/j.pc.20160603.01.

Ahmed, M. J.; Theydan, S. K. Adsorption of cephalexin onto activated carbons from Albizia lebeck seed pods by microwave-induced KOH and K₂CO₃ activations. *Chemical Engineering Journal*, 211–212 (2012) 200–207.

Babauta, J.; Renslow, R.; Lewandowski, Z.; Beyenal, H. Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling*, 28 (2012) 789-812. doi: 10.1080/08927014.2012.710324.

Bacon, C.W.; White Jr., J.F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68 (2016) 87-98. doi: 10.1007/s13199-015-0350-2.

Baeza, S.; Vejar, N.; Gulppi, M.; Azocar, M. *et al.* New evidence on the role of catalase in *Escherichia coli*-mediated biocorrosion. *Corrosion Science*, 67 (2013) 32-41. doi: 10.1016/j.corsci.2012.09.047.

Batmanghelicha, F.; Lib, L.; Seo, Y. Influence of multispecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron. *Corrosion Science*, 121 (2017) 94-104. doi: 10.1016/j.corsci.2017.03.008.

Baudaulf, C.; Côrrea, C.E.; Ciampi-Guillardi, M. *et al.* Moving from the ecological sustainability to the participatory management of janaguba (*Himatanthus drasticus*; Apocynaceae). In: Ecological sustainability for non-timber forest products: Dynamics and Case studies of harvesting. Shackleton, C.M.; Pandey, A.K.; Ticktin, T. 1^a ed. London and New York: Routledge, Taylor & Francis Group, 2015.

Bezerra JDP, Oliveira RJV, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, *et al.* Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. *Mycological Progress*, 16 (2017a) 297–309.

Bezerra JDP, Sandoval-Denis M, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, Souza-Motta CM, Crous PW. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. *IMA FUNGUS*· 8 (2017b) 77–97

Bhattacharya, S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. *Journal Pharmaceutical Biology*, 55 (2016) 349-354. doi: 10.1080/13880209.2016.1235207.

Blanco, M.A.; Negro, C.; Gaspar, L.; Tijero, J. Slime problems in the paper and board industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46 (1996) 203-208. doi: 10.1007/s002530050806.

Boeckel, T.P.V.; Gandra, S.; Ashok, A.; Caudron, Q.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Laxminarayan, R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14 (2014) 742-750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.

Chen, X. Wang, G.; Gao, F.; Wang, Y.; He, C. Effects of sulphate-reducing bacteria on crevice corrosion in X70 pipeline steel under disbonded coatings. *Corrosion Science*, 101 (2015) 1-11. doi: 10.1016/j.corsci.2015.06.015.

Choudhary, S.; Schmidt-Dannert, C. Applications of *quorum sensing* in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86 (2010) 1267-1279. doi: 10.1007/s00253-010-2521-7.

Corrêa, R.C.G.; Rhoden, S.A.; Mota, T.R.; Azevedo, J.L.; Pamphile, J.A. Souza, C.G.M.; Polizeli, M.L.T.M.; Rosane, A.B.; Peralta, M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41 (2014) 1467-1678. doi: 10.1007/s10295-014-1496-2.

Dapa, T.; Leuzzi, R.; Ng, Y.K.; Baban, S.T. *et al.* Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 195 (2012) 545-555. doi: 10.1128/JB.01980-12.

De Souza, F.S.; Gonçalves, R.S.; Spinelli, A. Assessment of caffeine adsorption onto mild steel surface as an eco-friendly corrosion inhibitor. *Journal Braz. Chem. Soc.*, 25 (2014) 81-90. doi: 10.5935/0103-5053.20130270.

Demain, A.L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41 (2014) 185-201. doi: 10.1007/s10295-013-1325-z.

Díaz-Tena, E.; Gallastegui, G.; Hipperdinger, M.; Donati, E.R.; Ramirez, M.; Rodriguez, A.; Lacalle, L.N.L.; Elias, A. New advances in copper biomachining by iron-oxidizing bacteria. *Corrosion Science*, 112 (2016) 385-392. doi: 10.1016/j.corsci.2016.08.001.

Enning, D.; Garrelfs, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an

old problem. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (2014) 1226–1236. doi: 10.1128/AEM.02848-13.

Faustin, M.; Maciuk, A.; Salvin, P.; Roos, C.; Lebrini, M. Corrosion inhibition of C38 steel by alkaloids extract of *Geissospermum laeve* in 1 M hydrochloric acid: Electrochemical and phytochemical studies. *Corrosion Science*, 92 (2015) 287-300. doi: 10.1016/j.corsci.2014.12.005.

Fletcher, M.H.; Jennings, M.C.; Wuest, W.M. Draining the moat: disrupting bacterial biofilms with natural products. *Tetrahedron*, 70 (2014) 6373-6383. doi: 10.1016/j.tet.2014.06.055.

GenBank. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em Janeiro de 2017.

Gentil, V., 2011. *Corrosão*, 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC editora.

Glass NL, Donaldson GC. Development of premier sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1995)1323–1330.

Hashem, M.; Sharaf, S.; Abd El-Hady, M.M.; Hebeish, A. Synthesis and characterization of novel carboxymethylcellulose hydrogels and carboxymethylcellulose-hydrogel-ZnO-nanocomposites. *Carbohydr Polym.* 95 (2013) 421-427. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.013.

Heil, M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens – a promising field for ecological research. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4 (2001) 65-79. doi: 10.1078/1433-8319-00015.

Ituen, E. Akaranta, O.; James, A.; Sun, S. Green and sustainable local biomaterials for oilfield chemicals: *Griffonia simplicifolia* extract as steel corrosion inhibitor in hydrochloric acid. *Sustainable Materials and Technologies*, 11 (2017) 12–18. doi: 10.1016/j.susmat.2016.12.001.

Kesavan, D.; Gopiraman, M.; Sulochana, N. Green inhibitors for corrosion of metals: A review. *Chemical Science Review and Letters*, 1 (2012) 1-8.

Kim, S-S.; Lee, S-Y.; Kang, C-D.; Lee, J-Y.; Cho, K-M. inventors; Samsung Electronics Co. LTDA, assignees. Yeast cell with activated lactate dehydrogenase and method of producing lactate using the yeast cell. United States patent US20150044740. 2014 24 July.

Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.R.B.; Taghavi, S.; Mezgeay, M.; van der Lelie, D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (2002) 583-606. doi: 10.1080/0735-260291044377.

Luo, H.; Zhu, L.; Chang, Y.; Liu, X.; Liu, Z.; Sun, H.; Li, X.; Yu, H.; Shen, Z. Microenvironmental pH changes in immobilized cephalosporin C acylase during a proton-producing reaction and regulation by a two-stage catalytic process. *Bioresource Technology*, 223 (2017) 157–165. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.038.

- Lukovits, I., Kálmán, E.; Zucchi, F. Corrosion inhibitors - Correlation between electronic structure and efficiency. *Corrosion*, 57 (2001) 3-8. doi: 10.5006/1.3290328.
- Mahapatra, S.; Banerjee, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers*, 97 (2013) 627-634. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.039.
- Malhadas, C.; Malheiro, C.; Pereira, J.A.; Pinho, P.G.; Baptista, P. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33 (2017) 46, 1-8. doi:10.1007/s11274-017-2216-7.
- Mathan, S.; Subramanian, V.; Nagamony, S.; Ganapathy, K. Isolation of endophytic fungi from marine algae and its bioactivity. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 4 (2013) 45-49.
- Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Ecologia Microbiana*. 1ª ed. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.
- Menezes, R.S.C.; Sampaio, E.V.S.B.; Giongo, V.; Pérez-Marin, A.M. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. *Braz. J. Biol.*, 72 (2012) 643-653. doi: 10.1590/S1519-69842012000400004.
- Moloney, M.G. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37 (2016) 689-701. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.001.
- Moradi, M.; Song, Z.; Nie, X.; Yan, M.; Hu, F.Q. Investigation of bacterial attachment and biofilm formation of two different *Pseudoalteromonas* species: Comparison of different methods. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 65 (2016) 70-78. doi: 10.1016/j.ijadhadh.2015.11.004.
- Motta, A.R.P.; Borges, C.P.; Kiperstok, A.; Esquerre, K.P.; Araujo, P.M.; Branco, L.P.N. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. *Eng. Sanitária Ambiental*, 18 (2013) 15-26. doi: 10.1590/S1413-41522013000100003.
- Mourya, P.; Banerjee, S.; Singh, M.M. Corrosion inhibition of mild steel in acidic solution by *Tagetes erecta* (Marigold flower) extract as a green inhibitor. *Corrosion Science*, 85 (2014) 352-363. doi: 10.1016/j.corsci.2014.04.036.
- NACE – *International Institute*. Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. Edition 2000. 06p.
- NACE/ASTM-TM0169 (G0031 12A). Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. Edition 2012. 10p.
- Njoku, D.; Ukaga, I.; Ikenna, O.B.; Oguzie, E.E.; Oguzie, K.L.; Ibisi, N. Natural products for materials protection: Corrosion protection of aluminium in hydrochloric acid by *Kola nitida* extract. *Journal of Molecular Liquids*, 219 (2016) 417-424. doi: 10.1016/j.molliq.2016.03.049.

- Noor, E.A.; Al-Moubaraki, A.; Al-Zhrani, A.H.; Hubani, M.H. Testing and comparing the inhibitory action of red onion seeds and peels extracts on the corrosion of steel in phosphoric acid. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11 (2016) 6523 – 6539. doi: 10.20964/2016.08.47.
- Palaniappan, B.; Toleti, S.R. Characterization of microfouling and corrosive bacterial community of a firewater distribution system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121 (2016) 435-441. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.08.009.
- Postgate, J.R.; Kent, H.M. Robson, R.L.; Chesshyre, J.A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *D. vulgaris*. *Microbiology*, 130 (1984) 1597-1601. doi: 10.1099/00221287-130-7-1597.
- Raja, P.B.; Sethuraman, M.G. Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media – A review. *Materials Letters*, 62 (2008) 113-116. doi: 10.1016/j.matlet.2007.04.079.
- Rosa, J.P.; Tibúrcio, S.R.G.; Marques, J.M.; Seldin, L.; Coelho, R.R.R. *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 4 (2016) 603–609. doi: 10.1016/j.bjm.2016.04.013.
- Roohina, F.; Mohammadi, M.; Najafpour, G.D. Immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells in carboxymethyl cellulose for production of ethanol from cheese whey: experimental and kinetic studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (2016) 1341-1349. doi: 10.1007/s00449-016-1610-0.
- Ryan, G.D.; Rasmussen, S.; Parsons, A.J.; Newman, J.A. The effects os carbohydrate supply and host genetic background on *Epichloe* endophyte and alkaloid concentrations in perennial ryegrass. *Fungal Ecology*, 18 (2015) 115-125. doi: 10.1016/j.funeco.2015.07.006.
- Silber, J.; Kramer, A.; Labes, A.; Tasdemir, D. From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Marine Drugs*, 14 (2016) 1-20. doi: 10.3390/md14070137.
- Silva, T.F.; Vollú, R.E.; Jurelevicius, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Blank, A.F.; Seldin, L. Does the essential oil *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect in endophytic microbial comunity? *BMC Microbiology*, 13 (2013) 1-14. doi: 1471-2180/13/29.
- Siqueira, V.M.; Conti, R.; Araújo, J.M.; Souza-Motta, C.M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*, 53 (2011) 89-95. doi: 10.10072Fs13199-011-0113-7.
- Skovhus, T.L.; Eckert, R.B.; Rodrigues, E. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study. *Journal of Biotechnology*, 256 (2017) 31-45. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.003.
- Solomon, M.M.; Umoren, S.A.; Udosoro, I.I.; Udoh, A.P. Inhibitive and adsorption behaviour of carboxymethyl cellulose on mild steel corrosion in sulphuric acid solution.

Corrosion Science, 52 (2010) 1317-1325. doi: 10.1016/j.corsci.2009.11.041.

Tang, H.J.; Lai, C-C.; Chen, C-C.; Zhang, C-C.; Weng, T-C.; Yu, W-L.; Chen, H-J.; Chiu, Y-H.; Ko, W-C.; Chuang, Y-C. Cephalosporin-glycopeptide combinations for use against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: enhanced *in vitro* antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017) 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2017.00884.

Tenjarla, S. Dissolution of commercially available mesalamine formulations at various pH levels. *Drugs R& D*, 15 (2015) 211-215. doi: 10.1007/s40268-015-0097-5.

Thomas, B.; Morten, A.; Østrup, J.P.; Anne K., N.; Krogh, J.H.; Preben, H.; Niels, H.; Michael, G.; Klaus, K-M. Antibiofilm properties of acetic acid. *Advances in Wound Care*, 4 (2015) 363-372. doi:10.1089/wound.2014.0554.

Togrul, H.; Arslan, N. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 54 (2003) 73-82. doi: 10.1016/S0144-8617(03)00147-4.

Torres, V.V.; Cabral, G.B.; Silva, A.C.G.; Ferreira, K.C.R.; D'Elia, E. Ação inibidora de extratos da semente do mamão papaia na corrosão do aço-carbono 1020 em HCL 1 mol L⁻¹. *Química Nova*, 39 (2016) 423-430. doi: 10.5935/0100-4042.20160046.

Umoren, S.A.; Solomon, M.M.; Udosoro, I.I.; Udoh, A.P. Synergistic and antagonistic effects between halide ions and carboxymethyl cellulose for the corrosion inhibition of mild steel in sulphuric acid solution. *Cellulose*, 17 (2010) 635-648. doi: 10.1007/s10570-010-9409-7.

Videla, H.A; Herrera, L.K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, 8 (2006) 169-180.

Vilgalys R, Hester M. Rapid identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172 (1990) 4238-4246.

Vogel, H.J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The American Naturalist*, 98 (1964) 435-446. doi: 10.1086/282338.

Xu, D., Li, Y. and Gu, T. D-Methionine as a biofilm dispersal signaling molecule enhanced tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate mitigation of *Desulfovibrio vulgaris* biofilm and biocorrosion pitting. *Materials and Corrosion*, 65 (2014) 837-845. doi: 10.1002/maco.201206894.

Zadeh, H.A.; Kohansal, S. Determination of mesalamine by spectrofluorometry in human serum after solid-phase extraction with Ni-Al layered double hydroxide as a nanosorbent. *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 473-481. doi: 10.1590/S0103-50532012000300014.

Zhao, L.; Meng, K.; Bai, Y. et al. Two family 11 xylanases from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing industry. *J. Agric. Food Chemistry*, 61 (2013) 6880-6889. doi: 10.1021/jf4001296.

Zhong, T.; Oporto, G.S.; Jaczynski, J.; Tesfai, A.T.; Armstrong, J. Antimicrobial properties of the hybrid copper nanoparticles-carboxymethyl cellulose. *Wood and Fiber Science*, 45 (2013) 215-222.

Zhou, W.; Wheeler, T.A.; Starr, J.L.; Valencia, C.U.; Sword, G.A. A fungal endophyte defensive symbiosis affects plant-nematode interactions in cotton. *Plant and Soil*, 1 (2016) 1-16. doi: 10.1007/s11104-016-3147-z.

Wang, K-W.; Wang, S-W.; Wu, B.; Wei, J-G. Bioactive natural compounds from the mangrove endophytic fungi. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14 (2014) 370-391.

White TJ, Bruns T, Lee J, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds): 315–322. San Diego: Academic Press, 1990.

Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Panphut, W. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microbiology Biotechnology*, 20 (2004) 265-271. doi: 10.1023/B:WIBI.0000023832.27679.a8.

Yang, M-H.; Li, T-X.; Wang, Y.; Liu, R-H.; Luo, J.; Kong, L-Y. Antimicrobial metabolites from the plant endophytic fungus *Penicillium* sp. *Fitoterapia*, 116 (2017) 72-76. doi: 10.1016/j.fitote.2016.11.008.

Yu, H. Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W.; Sun, P.; Qin, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165 (2010) 437-449. doi:10.1016/j.micres.2009.11.009.

Figuras:

Tabela 1: Parâmetros cinéticos obtidos a partir das curvas de polarização para aço carbono 1020 AISI em solução salina a 0.5M com a presença de biofilmes microbianos de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. e contendo os metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 200µg/L.

Metabolites (200µg/L)	b_a (mV/dec)	b_c (mV/dec)	E_{corr} (mV/Ag/AgCl)	I_{corr} ($A/cm^2 \times 10^{-6}$)	Corrosion rate (mm/year)	IE (%)
Control	176,23	62,943	-0,70308	2,93	0.3404900	-
LGS-Ff1	7,3172	17,065	-613,92	1,65	0.0019211	43,69
LGS-Ff2	3,1828	22,368	-647,61	4,30	0.0018871	-
LGS-Rb1	205,63	78,482	-643,06	2,24	0.2604100	23,55

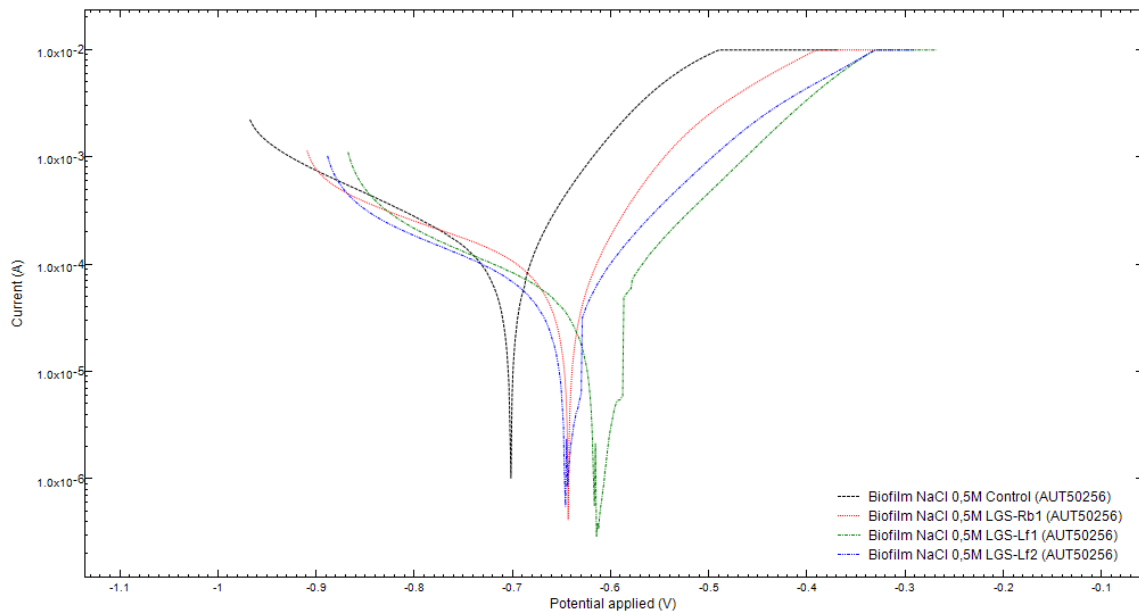


Figura 1: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 AISI com biofilmes microbiano de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na ausência e presença dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 200 µg/L.

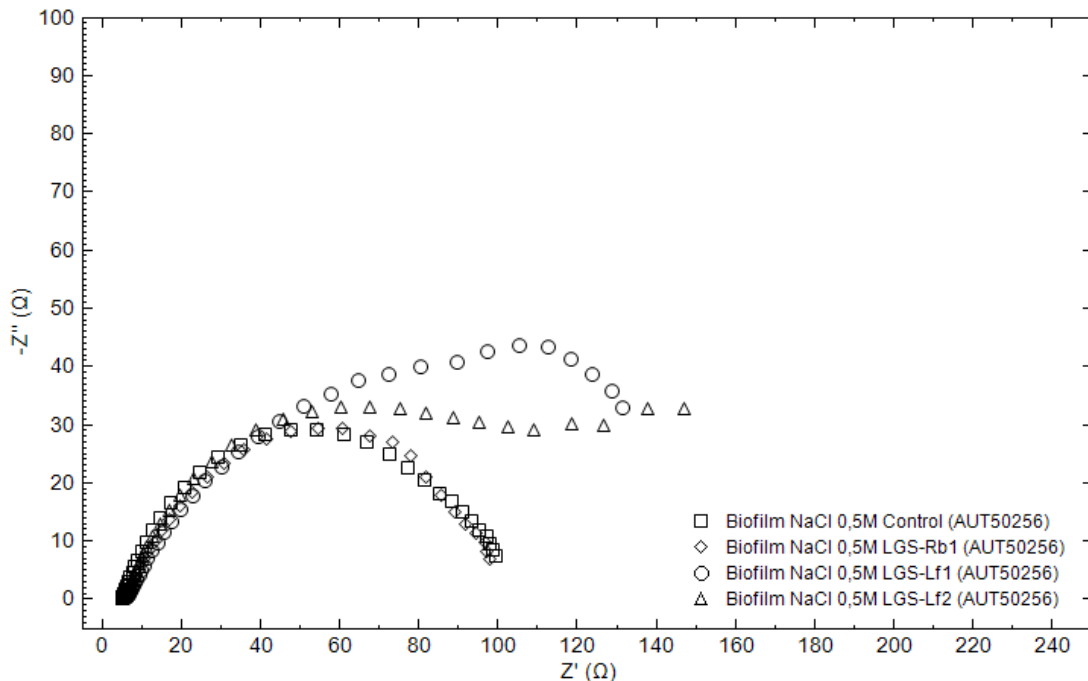


Figura 2: Diagramas de impedância eletroquímica do aço carbono AISI 1020 com presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na presença e ausência dos metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 200µg/L.

Tabela 2: Parâmetros eletroquímicos obtidos dos diagramas de impedância eletroquímica para o aço carbono AISI 1020 com presença de biofilme de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em solução NaCl (0.5M) na ausência e na presença de 200µg/L dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer.

Metabolites (200µg/L)	R_{ct} ($\Omega.cm^2$)	f_{max} (Hz)	C_{dc} ($\mu F/cm^2$)	n (%)
Control	642	1,55	578,03	-
LGS-Ff1	1953	5,00	1621,81	67,13
LGS-Ff2	773	2,78	3381,08	16,95
LGS-Rb1	538	2,78	2220,85	19,33

Tabela 3: Parâmetro cinéticos obtidos a partir das curvas de polarização para aço carbono 1020 AISI em solução salina a 0.5M com a presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. e contendo os metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer em associação (LGS-AM).

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	b_a (mV/dec)	b_c (mV/dec)	E_{corr} (mV/Ag/AgCl)	I_{corr} ($\text{A/cm}^2 \times 10^{-6}$)	Corrosion rate (mm/year)	IE (%)
Control	0,10459	0,070950	-0,58098	2,24	0.25993	-
LGS-AM	0,14420	0,048497	-0,65946	5,79	0.67286	0,0

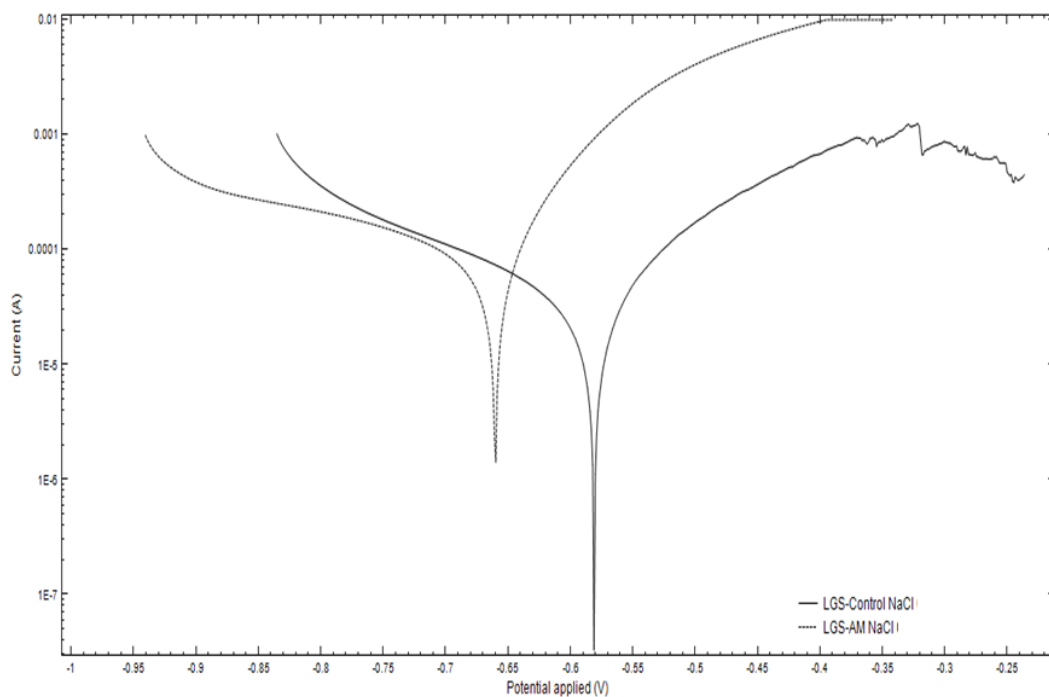


Figura 3: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 AISI com biofilmes microbiano de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na presença dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer em associação (LGS-AM).

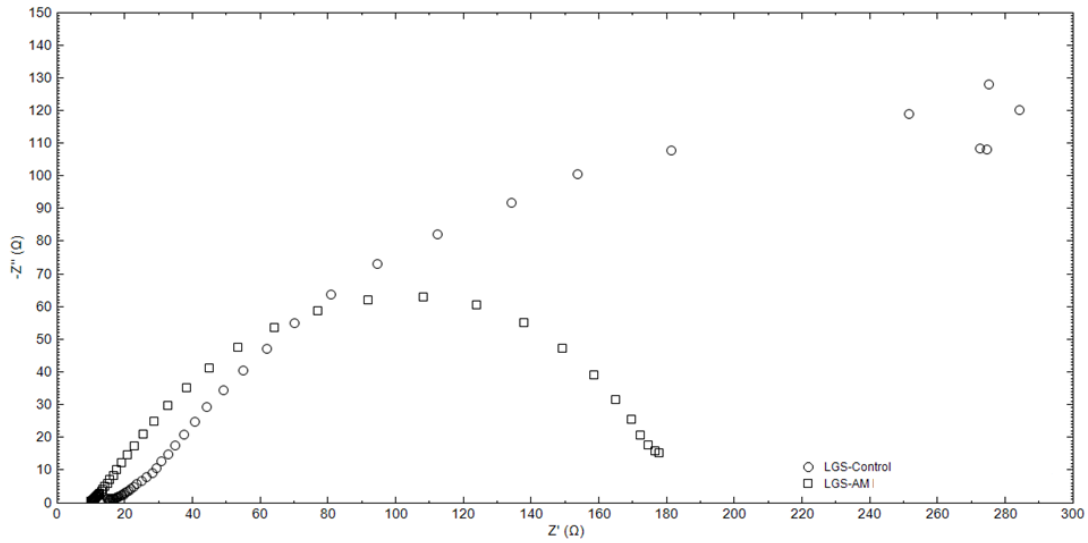


Figura 4: Diagramas de impedância para o aço carbono 1020 AISI com biofilmes microbiano de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na presença dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer em associação (LGS-AM, 200 µg/L).

Tabela 4: Parâmetro cinéticos obtidos a partir das curvas de polarização para aço carbono 1020 AISI em solução salina a 0.5M sem a presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. e contendo os metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer.

Concentration (µg/L)	b_a (mV/dec)	b_c (mV/dec)	E_{corr} (mV/Ag/AgCl)	I_{corr} (A/cm ² x 10 ⁻⁶)	Corrosion rate (mm/year)	IE (%)
LGS-Lf1						
0	8,3931	24,535	-535,71	3,67	0.00442606	-
100	3,3847	33,324	-514,71	1,82	0.00211150	50,41
150	7,8397	50,776	-608,84	1,62	0.00188710	55,85
200	1,3981	12,859	-547,27	7,97	0.00092609	-
LGS-Rb1						
0	6,8396	49,969	-585,06	3,26	0.00378410	-
100	7,8297	82,054	-690,54	5,22	0.00606230	-
150	12,212	52,312	-643,8	5,16	0.00600000	-
200	4,2102	55,499	-704,8	4,81	0.00055874	-
LGS-Lf2						
0	9,2485	34,203	-629,26	4,15	0.00482490	-
100	9,0746	44,678	-679,56	4,41	0.00512220	-
150	4,2536	22,869	-681,16	2,23	0.00259170	46,26
200	6,2199	61,142	-698,34	3,79	0.00440620	8,67

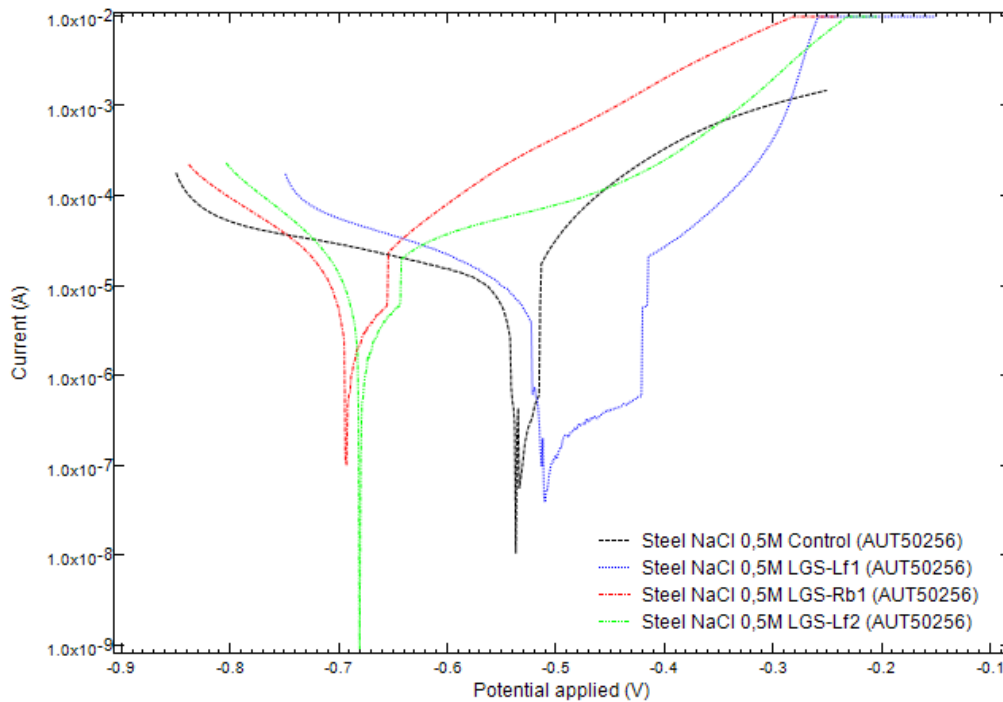


Figura 5: Curvas de polarização para o aço carbono 1020 AISI sem biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na ausência e presença dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 150 $\mu\text{g/L}$.

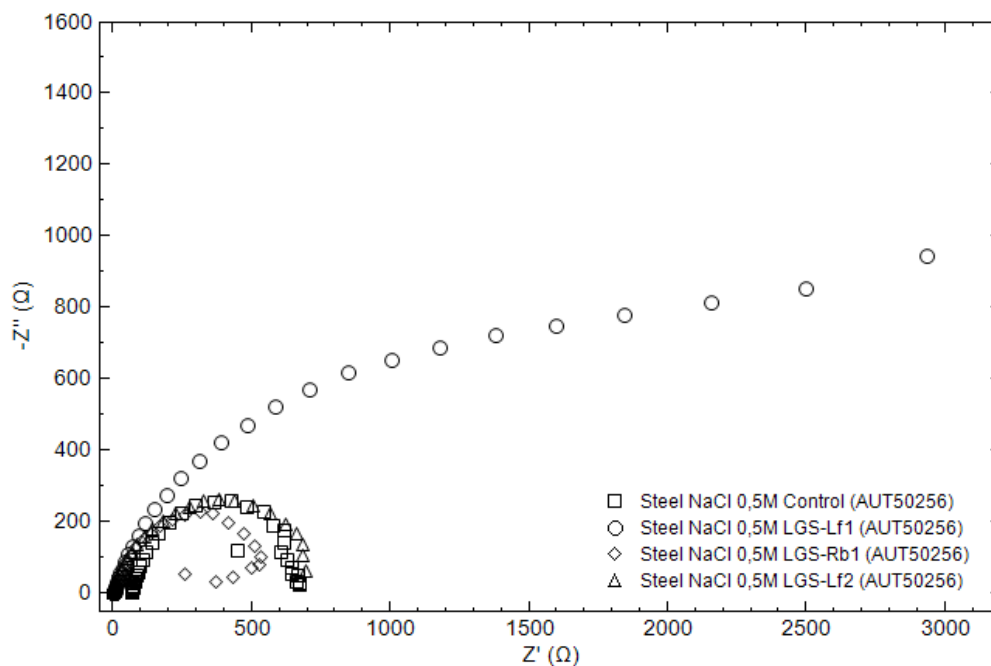
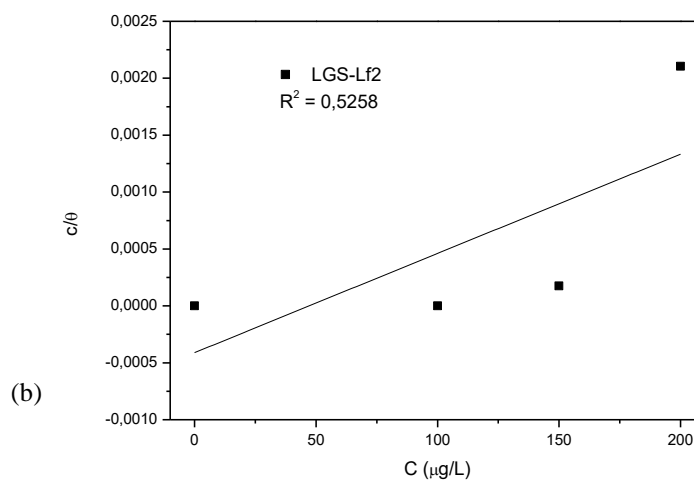
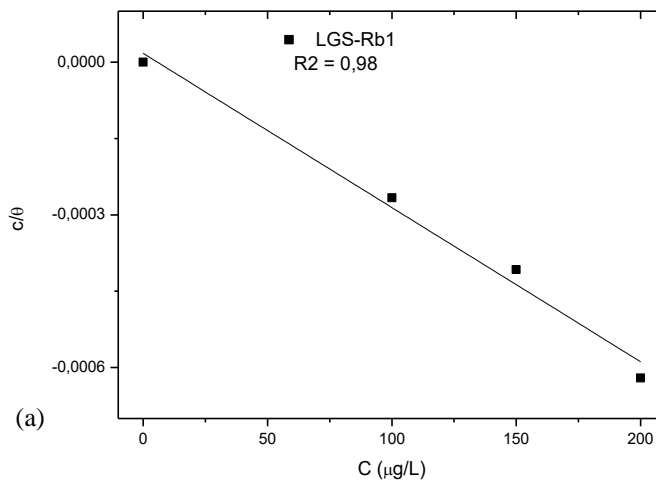


Figura 6: Diagramas de impedância eletroquímica do aço carbono 1020 AISI sem presença de biofilmes de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em meio salino (0.5M) na presença e ausência dos metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer na concentração de 150 $\mu\text{g/L}$.

Tabela 5: Parâmetros eletroquímicos obtidos dos diagramas de impedância eletroquímica para o aço carbono AISI 1020 sem biofilme de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. em solução NaCl (0.5M) na ausência e na presença de 200µg/L dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer.

Metabolites (200µg/L)	R _{ct} (Ω.cm ²)	f _{max} (Hz)	C _{dl} (µF/cm ²)	n (%)
Control	618	1,5513	563,4289	-
LGS-Ff1	2880	2,7839	1489,8594	78,54
LGS-Ff2	541	2,7839	2595,1071	-
LGS-Rb1	474	3,7294	1798,6198	-



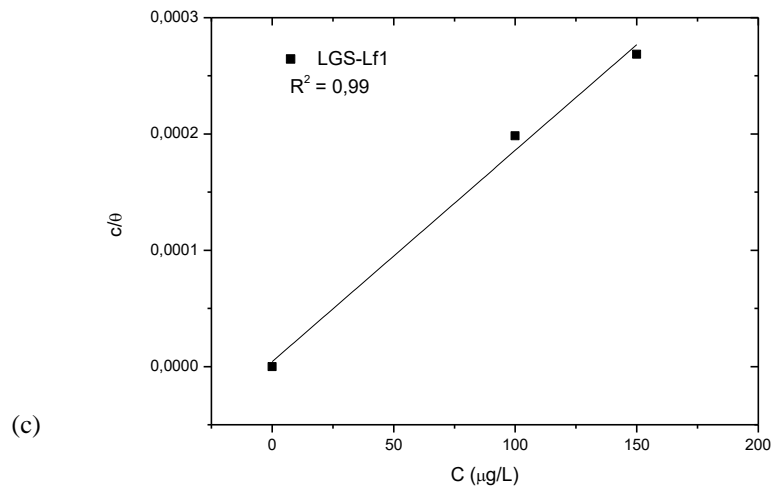
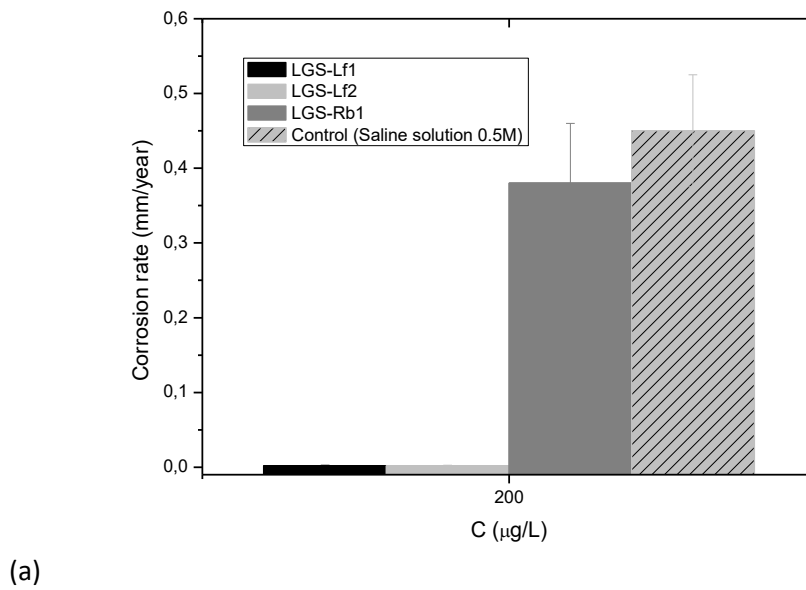
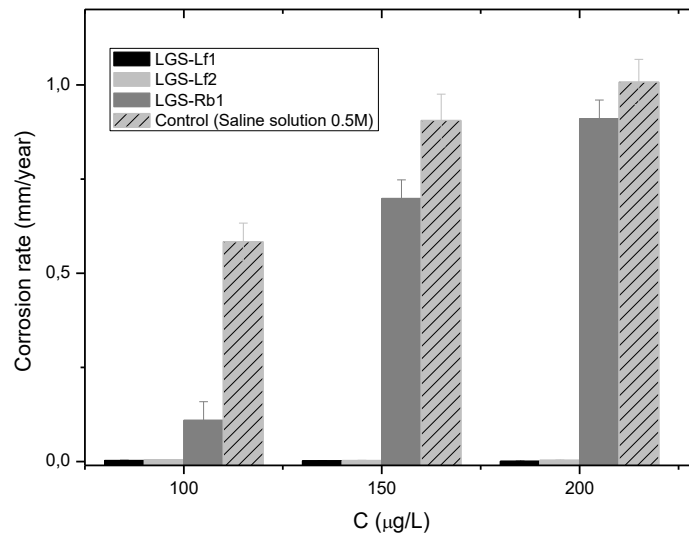


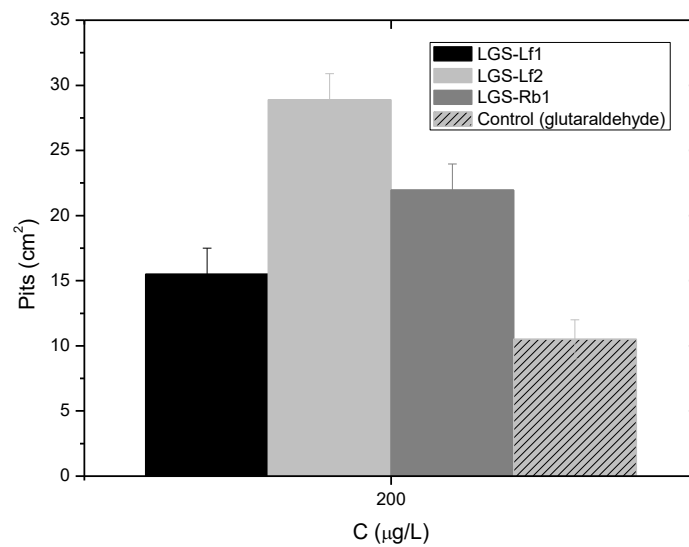
Figura 7: Isothermas de Langmuir para aço carbono AISI 1020 em solução salina (0.5M) e metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer em diferentes concentrações: (a) LGS-Rb1, (b) LGS-Ff2 (carboximetilcelulose) e (c) LGS-Ff1.



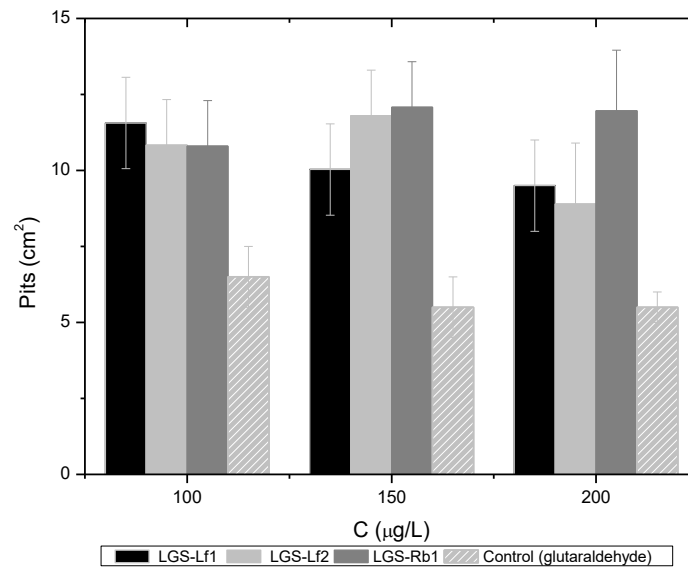


(b)

Figura 8: Taxa de corrosão por perda de massa em aço carbono AISI 1020 após tratamento com os metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer: (a) cupom com biofilme de *D. vulgaris* e *Gallionella* sp. após tratamento com 200 µg/L de cada metabólito e (b) sem biofilme em diferentes concentrações. Controle negativo: solução salina a 0.5M.



(a)



(b)

Figura 9: Média do número de pites em aço carbono 1020 AISI após ação dos metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer: (a) ensaio com biofilme na concentração de 200 µg/L e (b) sem biofilme microbiano em diferentes concentrações. Controle: glutaraldeído.

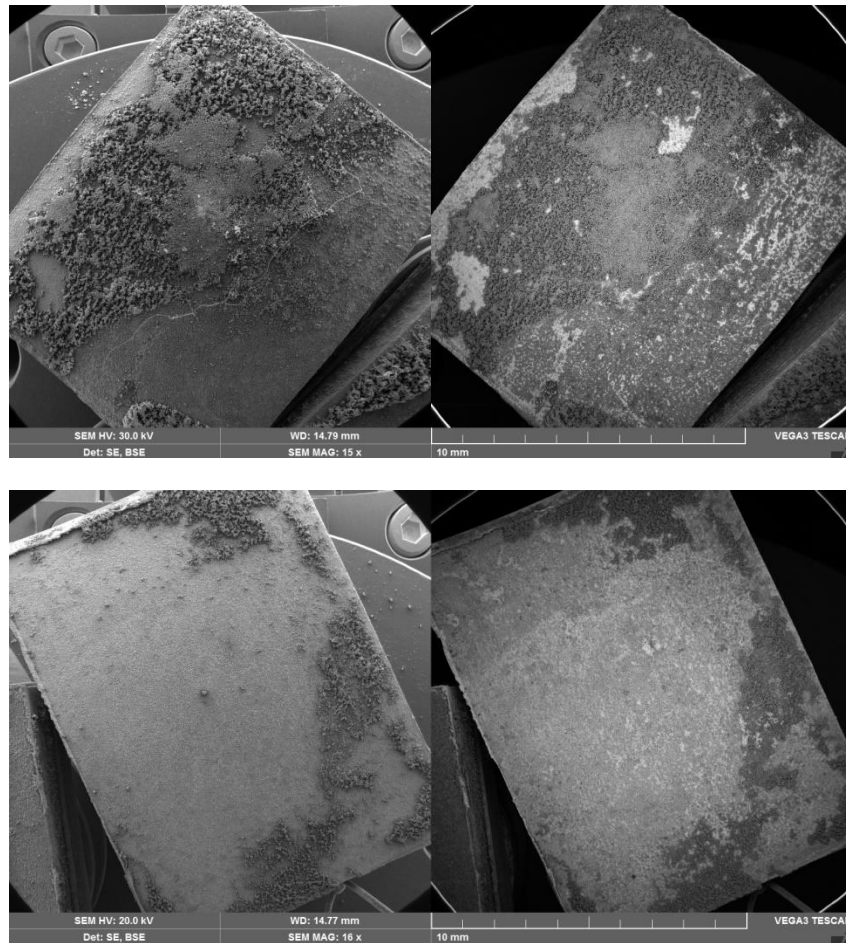


Figura 10: Micrografias eletrônicas de varredura de biofilmes microbianos em aço carbono 1020 AISI obtidas (a) antes (controle) e (b) após 180 minutos de contato com 200 µg/L do metabólito LGS-Ff1.

6.3. Manuscrito III:

Atividade biocida e *antibiofouling* de metabólitos de endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer sobre microrganismos em biofilme envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida (CMI)

Marcelino Gevilbergue Viana¹, Everaldo Silvino dos Santos¹, Cynthia Cavalcanti de Albuquerque², Jadson Diogo Pereira Bezerra³, Antônio Gilberto da Silva⁴, Vânia Sousa Andrade⁵.

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, Departamento de Engenharia Química – DEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

²Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – LCTV, Departamento de Ciências Biológicas – DCB, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN.

³Micoteca URM – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife – PE. Brasil.

⁴Laboratório de Ressonância Magnética – LRM, Departamento de Química – DQ, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR.

⁵Laboratório de Microbiologia Geral, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DMP, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

Resumo

Substâncias naturais com atividade antimicrobiana e *antibiofouling* agregam significativos impactos econômicos e ambientais nos diferentes setores industriais, principalmente quando são destinadas ao uso no controle da corrosão induzida por microrganismos. A atividade biocida e *antibiofouling* de metabólitos obtidos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer foi avaliada sobre biofilmes em aço carbono AISI 1020. Fungos e bactérias foram isolados da folha e raiz de *L. gracilis* Schauer, sendo seus metabólitos classificados em diferentes classes químicas. As principais espécies identificadas pelo sequenciamento genético foram: *Sordaria tomento-alba*, *Achaetomium* sp. e *Clostridium* sp. Uma nova espécie de fungo endofítico obtida da folha de *L. gracilis* Schauer foi identificada como *A. lippae*. O metabólito obtido de *S. tomento-alba* demonstrou melhor atividade biocida sobre biofilmes de cepas ATCC e o de *Clostridium* sp. sobre biofilmes de SRB, IOB e TAB. Todos os melhores resultados foram na maior concentração avaliada e ao fim do tempo de contato. A atividade *antibiofouling* foi verificada apenas por ação do metabólito de *S. tomento-alba* na concentração de 200µg/L, diferindo significativamente do controle e dos outros tratamentos ao fim do tempo de contato.

Palavras-chave: Endofíticos, *Achaetomium lippae*, metabólitos, *L. gracilis* Schauer, biofilme.

1. Introdução

O processo de degradação de materiais pela corrosão acomete a indústria de petróleo e gás nas suas mais variadas etapas de produção, refino e processos de armazenamentos. Os gastos direcionados para a prevenção e controle da corrosão podem alcançar milhões anuais nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos, comprometendo cerca de 1/3 do orçamento dos grandes setores industriais (Isotahdon, 2017). A corrosão provocada ou influenciada por microrganismos, também definida como biocorrosão, se insere nesse contexto e representa 20% de todos os casos de corrosão somente na indústria de petróleo (Liengen *et al.*, 2014).

A ação deteriorativa de diferentes tipos de materiais mediada por microrganismos é fortemente influenciada pela ação direta dos tipos específicos de microrganismos em biofilme e por produtos indiretos do seu metabolismo, como sulfetos, hidretos, óxidos como o férrico e até mesmo ácidos (Batmanghelich *et al.*, 2017). Bactérias oxidantes de ferro (BOFe), anaeróbicas totais (BAnT) e redutoras de sulfato (BRS) são tipos microbianos importantes dentro dessa comunidade por atuarem desencadeando a corrosão, seja por ação sinérgica ou de forma independente entre si, e por afetarem a dinâmica eletroquímica do processo corrosivo, ainda pouco estudada, porém bastante relevante (Fadl-allah *et al.*, 2016). Espécies do gênero *Gallionella*, *Pseudomonas* e *Desulfovibrio* constituem organismos amplamente presentes em reservatórios e tubulações de petróleo provocando na maioria das vezes a corrosão localizada (Loto, 2017), que ocorre de forma rápida, intensa e pontual, caracteristicamente na forma de *pitting* (Xu *et al.*, 2017). Os produtos resultantes do metabolismo dessas espécies bacterianas são considerados tão agressivos que a velocidade do processo corrosivo passa ser mais rápida (Haile *et al.*, 2015), principalmente sobre aço carbono, comumente usado revestindo tubulações e dutos de exploração e exploração (Videla & Herrera, 2006; El-Etre *et al.*, 2017).

Além da produção de substâncias agressiva a diversos tipos de materiais as bactérias aeróbicas totais juntamente com as metogênicas, BRS e as BOF passam a ser mais resistentes à ação de biocidas quando associadas em biofilmes (Carpén *et al.*, 2017). Biocidas como gluataraldeído, compostos aminados e quaternários podem, às vezes, não ser tão eficazes sobre o crescimento dessas bactérias, pois a combinação de subprodutos microbianos acabam, por vezes, neutralizando a ação da maioria dos biocidas rotineiramente usados (Venzlaff *et al.*, 2013), o que passa a demandar uso de outros biocidas em substituição ou alterações no plano de controle (Kim *et al.*, 2009). Outras desvantagens dos biocidas químicos são: a

toxicidade, o longo tempo de permanência no ambiente e a capacidade de bioacumular na flora e fauna presente no ambiente de descarte (Kahrilas *et al.*, 2015). Essas desvantagens, aliada às exigências ambientais, acabam impulsionando a pesquisa por novas substâncias ambientalmente aceitas, que sejam efetivas e, preferencialmente, de origem natural (Geoffrey, 2017). Produtos naturais obtidos de espécies nativas do ecossistema em questão ganham mais prioridades para futuras pesquisas em decorrência do possível uso sustentável ofertado para a população local como também por evitar desequilíbrios ambientais na flora e fauna (Silva & Rodrigues, 2014).

Substâncias derivadas do metabolismo de microrganismos possuem, na sua maioria, ampla atividade biocida sobre diferentes tipos microbianos, em especial aos patogênicos (Demain, 1999). Ao se prospectar espécies microbianas que habitam o interior de vegetais a oferta de possíveis novas substâncias com tais propriedades se amplia ainda mais (Mousa & Raizada, 2013) e com objetivo de controlar a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) a ideia torna-se ainda mais promissora. *Lippia gracilis* Schauer é uma espécie bem distribuída nas Américas e nativa do bioma Caatinga com prevalência em toda região Nordeste do Brasil (Hennebelle *et al.*, 2008). Suas propriedades medicinais e terapêuticas são reconhecidas mundialmente, sendo adotadas nas comunidades nativas da região Semiárida do Brasil (Djengue *et al.*, 2017). Alguns microrganismos endofíticos já foram isolados e identificados pertencentes a algumas espécies do gênero *Lippia* (Siqueira *et al.*, 2012). Entretanto, nada ainda foi realizado com intuito de prospecção de microrganismos desse gênero para produção de substâncias com potencial biocida específico para biofilmes envolvidos na CMI e no consequente controle da corrosão.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade biocida e *antibiofouling* de metabólitos obtidos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer sobre biofilmes de *Desulfovibrio* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Gallionella* sp. (ATCC), cultivados isoladamente sobre aço carbono AISI 1020, bem como sobre biofilmes de bactérias redutoras de sulfato (BRS), oxidantes de ferro (BOFe) e anaeróbias totais (BAnT) também em biocupons de aço carbono AISI 1020.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e identificação de *L. gracilis* Schauer

Amostras de *L. gracilis* Schauer foram coletadas em fragmentos do bioma Caatinga (5°22'43.85''Sul – 37°30'12.25''Oeste) a 150m do nível do mar, localizado na cidade de

Mossoró, Rio Grande do Norte – Brasil. A identificação da espécie foi realizada pelo biólogo taxonomista José Iranildo Miranda de Melo, pesquisador da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, e um exemplar depositado em exsicata no herbário “Dárdano de Andrade” da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), com o respectivo número de tombo: 12514.

As raízes e folhas de *L. gracilis* Schauer foram coletadas de dois indivíduos na mesma área, posteriormente separadas, pesadas e mantidas em sacos de papel para isolamento dos microrganismos endofíticos.

2.2. Isolamento e conservação dos endofíticos

O material vegetal foi inicialmente processado após 24 horas da coleta. O isolamento foi feito a partir de testes de presença e ausência como também ensaios quantitativos seguindo a metodologia de Strobel & Daisy (2003). Para a primeira avaliação as folhas e raízes de *L. gracilis* Schauer foram coletadas e separadas, retirando-se fragmentos com cerca de 10 cm² de cada parte vegetal. Os fragmentos foram desinfestados para a retirada dos microrganismos epífitos, sendo lavados inicialmente com etanol a 70% (por 5 minutos), em seguida com hipoclorito de sódio a 3% (por 10 minutos) e novamente tratados com etanol a 70% (por 5 minutos). Por fim, foram lavados com água esterilizada deionizada durante cinco minutos para retirada do excesso e alíquotas de 50 µL da última lavagem foram retiradas e depositadas em meio de cultura para controle da assepsia.

Para o isolamento dos fungos endofíticos o material vegetal desinfestado foi cortado em fragmentos pequenos de 01 cm² e distribuídos na superfície dos meios sólidos BDA (batata-dextrose-ágar) e Vogel (Vogel *et al.*, 1964), de pH 4.5, contendo 50 µg/mL do antibiótico ampicilina. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C até o crescimento dos fungos serem visíveis. Uma porção de cada micélio morfológicamente distinto, que cresceu dos segmentos das plantas durante o período de incubação, foi retirada e transferida para placas contendo meio BDA sem antibiótico para purificação do isolado. Os isolados de cada fungo foram armazenados em meio sólido BDA inclinado a 4° C, em microtubos contendo água destilada a 4° C e em glicerol (30%) a -70° C, sendo encaminhados à identificação taxonômica.

O isolamento das bactérias endofíticas seguiu a metodologia de Nobrega *et al.* (2012). Macerou-se cerca de 1g das amostras vegetais desinfetadas em 09 mL de solução salina (0.85%) estéril. A suspensão obtida foi diluída serialmente e alíquotas de 0.1 mL de cada

diluição plaqueada em meio sólido TSA (Ágar-Triptona de Soja) a pH 7.0, contendo 50 µg/mL do antifúngico benomil. As placas inoculadas foram mantidas a 28°C em estufa bacteriológica por até 10 dias, sendo o crescimento acompanhado diariamente. Após, o completo crescimento bacteriano a taxa de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinada. Por fim, a densidade da população de bactérias endofíticas foi estimada pelo peso fresco de cada parte vegetal e pelo fator de diluição. As diferentes colônias crescidas foram repicadas e transferidas para meio TSA sem antifúngico para purificação do isolado. As bactérias isoladas foram armazenadas em meio sólido TSA inclinado a 4° C e em glicerol 30% a -80° C, para posterior identificação taxonômica por métodos biomoleculares.

2.3. Identificação molecular dos microrganismos endofíticos

2.3.1. Identificação dos fungos

Para uma análise morfológica prévia os fungos endofíticos foram cultivados em meio de cultura em ágar extrato de malte (AEM) e batata dextrose agar (BDA), sendo mantidos à 25 °C por ciclo de fotoperíodo. A extração do DNA foi realizada utilizando kit de purificação Wizard® Genomic DNA (Promega, USA) seguindo as orientações do fabricante. Para amplificação de parte dos genes LSU rDNA, ITS nrDNA, *tef1* e *tub2* foram usados primers LR0R e LR5 (Vilgalys & Hester, 1990); ITS5 e ITS4 (White *et al.* 1990); EF3Fd (Groenewald *et al.* 2013) e EF1-2218R (www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf); Bt2a e Bt2b (Glass & Donaldson, 1995), respectivamente. A amplificação do DNA (PCR), o sequenciamento e a análise genética das sequências foram realizados seguindo a metodologia descrita por Bezzera *et al.* (2017a e b) e Oliveira *et al.* (2014).

2.3.2. Identificação bacteriana

O sequenciamento da subunidade 16S rRNA foi realizada e comparada de DNA. A identificação biomolecular das cepas isoladas foi realizada a partir do sequenciamento do gene da subunidade 16S de RNA ribossomal e posterior comparação com o banco de dados de seqüências de DNA e proteínas, Genbank, (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A extração de DNA dos cultivos bacterianos foi realizada com uso do kit MOBio UltraClean Microbial DNA®, conforme as instruções do fabricante. O DNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% e marcação com SYBR Safe®. A partir do DNA obtido após a etapa de extração, o gene de RNA 16S (1500pb) foi amplificado através de PCR utilizando os primers universais para bactérias, SAdir

(5'AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') e S17rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Applied Biosystems). As condições de termociclagem foram: um ciclo inicial de desnaturação (94°C por 5 minutos); 30 ciclos intermediários de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) e um ciclo de extensão final (72°C por 5 minutos).

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% com marcação por SYBR Safe e purificados com o kit UltraClean® PCR Clean-up® (MOBio). Após purificação, a quantidade e a pureza dos produtos de PCR foram determinadas por densidade ótica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific). Os produtos de PCR foram enviados para o seqüenciamento, realizado pelo Setor de Sequenciamento de DNA (Centro de Estudos do Genoma Humano – USP), em seqüenciador automático MEGABACE 1000.

Os resultados do seqüenciamento foram verificados com a ajuda do programa Chromas Lite, versão 2.01 (McCarthy, 1996 – www.technelysium.com.au). As seqüências de DNA obtidas foram comparadas às seqüências depositadas no banco de dados de seqüências de DNA e proteínas, Genbank, (www.ncbi.nlm.nih.gov). As similaridades entre as seqüências foram analisadas pelo programa BLASTn (Basic Alignment Search Tool).

2.4. Obtenção dos metabólitos dos microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos mais prevalentes nas amostras dos isolados das folhas e raízes de *L. gracilis* Schauer foram conservados e mantidos em coleção microbiológica. De cada fungo foi retirado pequenos discos miceliais de 06 mm de diâmetro, postos em contato com 500 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) de pH 4.5 em *Erlenmeyers* e submetidos à agitação de 50 rpm em aparelho *shaker* por dez dias a 35° C para a produção do caldo fermentado. Já para as bactérias cada cepa pura obtida foi repicada para meio caldo nutriente em pH 7.0, ajustado o inóculo a 0.5 na escala McFarland (1.5×10^8 UFC/ml) após 48 horas de crescimento e centrifugados a 5000 rpm por cinco minutos. Os *pellets* obtidos foram depositados separadamente em 50 ml de meio caldo nutriente com pH 7.0 em *Erlenmeyers* e mantidos em agitação de 50 rpm/minuto por sete dias a 25° C em aparelho *shaker*.

Após crescimento fúngico e bacteriano em biorreator, o caldo fermentado foi homogeneizado vigorosamente, filtrado em membrana de papel (Whatman n° 1 - 0.22 µm) e

centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos, filtrado e por fim liofilizados (Free Zone 4.5), sendo mantido em recipientes fechados à temperatura ambiente.

Foram obtidos três metabólitos: dois de fungos (LGS-Ff1 e LGS-Ff2, onde “LGS” para *L. gracilis* Schauer, “F”: folha; “f”: fungo e “R” para raiz) e um de bactéria (LGS-Rb1, onde “LGS” para *L. gracilis* Schauer, “R”: raiz e “b”: bactéria). A caracterização dos metabólitos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM) e por ressonância magnética (RMN) para identificação das biomoléculas presentes e definição química geral.

2.5. Reativação das cepas bacterianas e obtenção dos biofilmes

As cepas bacterianas liofilizadas de *Desulfovibrio* sp., *P. aeruginosa* e *Gallionella* sp. (ATCC), isoladas de água de produção de petróleo, foram fornecidas pelo Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO) do Instituto Nacional de Tecnologia – INT, localizado no Rio de Janeiro – RJ, Brasil. A reativação das cepas seguiu metodologias diferenciadas de acordo com o metabolismo típico de cada espécie, utilizando meios de cultura específicos e condições de prevalência ou não de oxigênio.

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio* sp. foi mantida em meio de cultura Postgate E (Postgate *et al.*, 1984) a 35° C por três semanas em condições de anaerobiose para pleno crescimento, identificado pela presença de sulfeto. Posteriormente, cerca de 1.0mL foram retirados e adicionados em frascos vedados contendo Postgate E, purgados com N₂ para retirada do oxigênio. Já a bactéria oxidante de ferro, *Gallionella* sp., foi reativada em meio citrato férrico amoniacal (10g citrato férrico amoniacal; 0.5g (NH₄)₂SO₄; 0.2g CaCl₂.6H₂O; 0.5g MgSO₄.7H₂O; 0.5g NaNO₃; 0.5g K₂HPO₄/1000mL de água destilada), a 30° C durante duas semanas em condições aeróbias, porém protegidas da luz. Por fim, *P. aeruginosa* foi mantida em meio caldo nutriente (1.0 g de extrato de bife; 2.0 g extrato de levedura; 5.0g peptona e 5.0g de NaCl/1000mL de água destilada) por 48 horas, à temperatura ambiente, também em condição aeróbia.

A obtenção dos biofilmes de *P. aeruginosa*, *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp. seguiu a metodologia de Moreno *et al.* (1993) com algumas modificações. Foram utilizados biocupons de aço carbono AISI 1020 com dimensões de 7.0 x 2.5cm, sendo previamente lixados, esterilizados e tratados, seguindo o protocolo da NACE-TM (2000). Os biocupons foram mantidos suspensos perpendicularmente em *Erlenmeyers* (500 ml) contendo meios de

cultura específicos para cada espécie bacteriana. Inóculos padronizados (10^7 células/mL) de *P. aeruginosa*, *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp. foram adicionados aos meios de cultura separadamente em cada *Erlenmeyer*, sendo mantidos fechados com algodão. Apenas o cultivo de *Desulfovibrio* sp. foi diferenciado, sendo os recipientes vedados e o meio de cultura desaerado com N_2 para manter a condição de anaerobiose.

Todos os inóculos bacterianos foram mantidos em agitação (60 rpm/min) em aparelho *shaker*, porém com diferentes temperaturas e período de incubação. Para obtenção dos biofilmes de *P. aeruginosa* foram mantidos durante sete dias à 28° C, de *Gallionella* sp. à 30° C por 15 dias e para *Desulfovibrio* sp por trinta dias à 35° C.

A obtenção dos biofilmes de BRS, BAnT e de BOFe seguiu metodologia diferenciada, sendo obtidos a partir da água de produção de petróleo, fornecida pela Empresa Brasileira de Petróleo e Gás – PETROBRAS. Os biocupons de aço carbono AISI 1020 foram inicialmente tratados para a retirada de impurezas e excesso de óleo como descrito anteriormente. Posteriormente, foram dispostos em *Erlenmyers*, de forma perpendicular, em contato com 300 mL de água de produção de petróleo e mantidos sob agitação em aparelho *shaker* (80 rpm/min), a 30° C, por dez dias. Ao fim do período de contato os biocupons foram retirados com plena formação de biofilme e submetidos aos diferentes tratamentos com os metabólitos.

2.6. Atividade biocida e *antibiofouling* dos metabólitos

2.6.1. Atividade biocida sobre biofilmes de *P. aeruginosa*, *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp.

A atividade biocida seguiu o mesmo protocolo (Clark *et al.*, 2007) para todas as espécies de bactérias avaliadas, apenas com algumas modificações e adaptações sugeridas por Rosa *et al.* (2016). Após a obtenção dos biofilmes em *shaker* os biocupons foram adicionados de forma perpendicular em *Erlenmyers* contendo 500 mL de solução salina (NaCl a 0.5M) adicionados com cada um dos três metabólitos separadamente em diferentes concentrações: 0, 150 e 200 $\mu\text{g/L}$. O tempo de contato também foi variado, sendo avaliado após dois, quatro e seis dias com cada concentração.

Após o período de contato com os metabólitos os biocupons contendo biofilmes foram retirados, depositados em placas de Petri e submergidos em cristal de violeta (1.0%) por dez minutos, retirado o excesso em água Milli-Q e mantidos em solução de álcool/acetona (80:20 v/v) por 20 minutos. Por fim, os biocupons foram decapados para retirada do biofilme

total e a solução resultante contendo o biofilme foi mensurada espectrofotometricamente a OD₅₈₀. Como controle foi utilizado biofilme sem contato com os metabólitos e a relação entre a absorvância do controle (OD₅₈₀) e dos tratamentos foi estimada para analisar a eficiência de inibição. A relação da absorvância entre as células planctônicas dos inóculos (OD₆₀₀) com a do controle (OD₅₈₀) também foi obtida para se determinar a formação do biofilme. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e atendendo as condições de anaerobiose para *Desulfovibrio* sp.

Como teste complementar aos resultados obtidos por espectrofotometria foi realizada a quantificação por número mais provável (NMP) dos mesmos cupons contendo os mesmos biofilmes, também em triplicata.

2.6.2. Atividade biocida sobre biofilmes de BRS, BOFe e BAnT

A atividade biocida para esse grupo bacteriano foi avaliada pela relação entre a absorvância do controle (OD₆₀₀) e dos tratamentos, sendo estimada para analisar a eficiência de inibição (Sánchez-Andrea *et al.*, 2015), e pela taxa de número mais provável (NMP) como forma complementar dos resultados de espectrofotometria. Os tratamentos consistiram no contato direto dos biofilmes com: 0, 150 e 200 µg/L de cada metabólito. O tempo de contato foi o mesmo utilizado no ensaio anterior. Como controle positivo foi utilizado glutaraldeído a 5% e como controle negativo água destilada deionizada. Os testes foram realizados em triplicata, sendo obtidas as médias da taxa de crescimento e as diferindo utilizando o teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

2.6.3. Atividade antibiofouling

A atividade *antibiofouling* dos metabólitos também foi avaliada com objetivo de verificar sua ação preventiva na formação de biofilmes apenas para as bactérias redutoras de sulfato (BRS), oxidantes de ferro (BOFe) e anaeróbias totais (BAT), obtidas da água de produção de petróleo. Para isso biocupons de aço carbono AISI 1020 foram previamente tratados para retiradas de impurezas e devidamente esterilizados. O tratamento consistiu em lavagem com dicloroetileno por 15 minutos e consecutivamente em álcool etílico e acetona por 10 minutos. Por fim, lavados em água Mili-Q. Após o tratamento os biocupons foram secos, postos em placas de Petri (10 cm) e mantidos por 48 horas submersos em 100 ml de água destilada deionizada contendo diferentes concentrações de cada um dos três metabólitos. As concentrações avaliadas foram: 0, 150 e 200 µg/L.

Ao término do período de contato com os tratamentos cada biocupom foi imediatamente submetido à formação dos biofilmes bacterianos como descrito no item 2.5. A avaliação *antibiofouling* se deu pela mesma metodologia empregada na atividade biocida para todos os tipos de biofilmes, pela obtenção de isothermas de adsorção e por obtenção de MEVs. O ensaio também foi feito em triplicata, sendo cada repetição representada por um biocupom.

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação dos microrganismos endofíticos

Baseado na morfologia e pesquisas no GenBank (NCBI) usando diferentes sequências de DNA, foi possível identificar os isolados LGS-Ff2 e LGS-Ff3 como *Sordaria tomentoalba* Cailleux e o isolado LGS-Ff1 como *Chaetomium* sp.

A pesquisa realizada no GenBank, usando sequências da região LSU dos fungos LGS-Ff2 e LGS-Ff3, mostrou que esses isolados estão proximadamente relacionados com *Sordaria brevicollis* (FR774288; Semelhança 797/797(100%), *gaps* 0/797(0%)), *Sordaria tomentoalba* (AY681161; Semelhança 797/797(100%), *gaps* 0/797(0%)), entre outros. O sequenciamento usando sequências ITS mostrou semelhança com *Sordaria tomentoalba* (AY681195; Semelhança 540/544(99%), *gaps* 2/544(0%)), *Gelasinospora tetrasperma* (NR_077163; Semelhança 535/541(99%), *gaps* 1/541(0%)), entre outros. Sequenciamento de *tef1* também mostrou semelhança com *Sordaria tomentoalba* (FR774391; Semelhança 484/489(99%); *gaps* 0/489(0%)), *Sordaria sclerogenia* (FR774390; Semelhança 447/489(91%), *gaps* 7/489(1%)), *Sordaria brevicollis* (FR774387; Semelhança 448/491(91%), *gaps* 6/491(1%)), e baixa compatibilidade com outras espécies dos gêneros *Neurospora* e *Gelasinospora*. A partir do sequenciamento de *tub2*, os isolados LGS-Ff2 e LGS-Ff3 foram relacionados com maior proximidade à *Sordaria tomentoalba* (AY681229; Semelhança 482/496(97%), *gaps* 2/496(0%)), seguida à *Sordaria sclerogenia* (FR774341; Semelhança 451/468(96%), *gaps* 1/468(0%)), e baixa correlação com outras espécies dos gêneros *Sordaria*, *Neurospora* e *Gelasinospora*.

Com o sequenciamento da região LSU e pesquisas no banco de dados (GenBank) o isolado LGS-Ff1 mostrou-se mais aproximado com *Chaetomium strumarium* (AY681170; Semelhança 792/797(99%), *gaps* 1/797(0%)), *Chaetomium globosum* (JX280684; Semelhança 789/797(99%), *gaps* 1/797(0%)), e com outras espécies *Chaetomium*. O sequenciamento da região ITS também demonstrou relação proximada a *Chaetomium* sp. (HQ607809; Semelhança 564/587(96%), *gaps* 8/587(1%)), *Chaetomium strumarium*

(AY681204; Semelhança 562/592(95%), gaps 13/592(2%)) e KP941089 (semelhança 438/460(95%), gaps 8/460(1%)), além de outros. Com base no sequenciamento de *tef1* o isolado apresentou baixa identidade (menor que 93%) com diferentes gêneros, incluindo *Neurospora*, *Gelasinospora*, *Sordaria*, entre outros. Da mesma forma o sequenciamento de *tub2* mostrou muito baixa identidade com *Chaetomium strumarium* (AY681238; Semelhança 420/487(86%), gaps 7/487(1%)), com outras espécies desse gênero e com outros gêneros.

A partir dessas análises o isolado LGS-Ff1 foi considerado ser uma nova espécie do gênero *Achaetomium*. O cladograma mostra a relação filogenética de *A. lippae* com *A. luteum* a partir do sequenciamento genético (Fig. 1).

Em relação à identificação de bactérias o único gênero identificado pelo sequenciamento da região ribossomal 16S foi *Clostridium*, identificado com 99% de similaridade de acordo com o GenBank. Porém, a espécie não foi definida, sendo classificada com *Clostridium* sp., isolada de ambas as partes de *L. gracilis* Schauer e com maior prevalência na raiz (54%).

Outros tipos de microrganismos de *L. gracilis* Schauer foram isolados a partir da utilização dos meios de cultura específicos para endofíticos. Porém, grande parte não se desenvolveu nos meios de cultura utilizados ou foram inviabilizados antes mesmo do repique para purificação das culturas e identificação. Microrganismos endofíticos possuem relação ecológica muito íntima às condições do seu hospedeiro e o isolamento interfere e altera diretamente essa relação (Nair & Padmavathy, 2014). Por isso, são considerados microrganismos fastidiosos ou de crescimento muito lento (Aguilar-Trigueros & Rilling, 2016), o que dificulta o isolamento, cultivo e identificação.

Os microrganismos endofíticos de *L. gracilis* aqui identificados, com potencial sobre a inibição da corrosão microbiologicamente induzida, são espécies pioneiras na literatura, com destaque, em especial, para a nova espécie de fungo: *A. lippae*. Dentro do gênero *Lippia* diferentes gêneros têm sido isolados e classificados como endofíticos de diferentes partes da planta, mas nenhum similar aos aqui identificados. Espécies de fungos, como *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Colletotrichum* sp., foram recentemente obtidas de *L. sidoides* e caracterizadas na produção de metabólitos com atividade antimicrobiana sobre microrganismos fitopatogênicos (Ferreira *et al.*, 2017). Já sobre microrganismos patogênicos alguns fungos endofíticos isolados dessa mesma espécie de *Lippia* demonstraram significativa ação antimicrobiana (Siqueira *et al.*, 2011). De forma geral não há um padrão de distribuição de endofíticos dentro do seu hospedeiro (Uzma *et al.*, 2016). Porém, os fungos endofíticos no

gênero *Lippia* estão mais frequentemente presentes nas folhas e cascas (Siqueira *et al.*, 2011). Porém, a razão para tal distribuição ainda não está definida.

Em relação à bactéria, diferentes gêneros como *Bacillus* e *Paenibacillus* estão amplamente presentes como endofíticos de *Lippia* (Silva *et al.*, 2013) e assim como esses gêneros outras espécies são apontadas com potencial antimicrobiano (Arrieta *et al.*, 2017). *Lactococcus lactis* e outras espécies importantes desse mesmo gênero, isoladas de *L. sidoides*, são também comumente encontrada em *Lippia*, demonstrando ter potencial de mineralização de fosfato a partir do seu metabolismo celular (Lacerda *et al.*, 2016). Outras espécies endofíticas de *Lippia* apresentam potencial biotecnológico já discutido na literatura (Brader *et al.*, 2014).

3.2. Identificação química dos metabólitos e atividade biocida

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM) e por RMN mostram que os metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Shauer pertencem a diferentes classes químicas. O metabólito obtido de *S. tomentoalba* (LGS-Ff1) foi classificado previamente como um ácido com grupo amino funcional (Figura 2a) e o de *A. lippae* como carboximetilcelulose, um carboidrato de cadeia longa (Fig. 2b). A substância obtida de *Clostridium* sp. classifica-se, previamente, como pertencente ao grupo das cefalosporinas (Fig. 2c), antibióticos de amplo espectro antimicrobiano e bastante comercial (Aminov, 2017).

O gênero *Sordaria* é um dos três principais pertencentes à família *Sordariaceae*, caracterizada por espécies de grande importância para estudos biológicos, bioquímicos e genéticos (Teichert, 2017). As espécies *Sordaria* apresentam esporos com paredes lisas e bainha gelatinosa, e habitam, preferencialmente, solos e, em alguns casos, ambientes com grande quantidade de matéria orgânica (Cai *et al.*, 2006). *Sordaria tomento-alba* é um fungo endofítico, típico de espécies que habitam ambientes estressantes, como regiões áridas e semi-áridas (Loro *et al.*, 2012). Geralmente essa espécie está associada à plantas com propriedades medicinais e que pode produzir substâncias com o mesmo potencial (Carvalho *et al.*, 2012). A atividade antimicrobiana para as substâncias produzidas por espécies *Sordaria* tem sido relatada, em especial sobre bactérias (Tejesvi *et al.*, 2011) e rotas bioquímicas envolvendo a produção de ácidos, direta ou indiretamente, podem estar presentes nos representantes desse gênero (Kim *et al.*, 2016), como comprovamos também. Entretanto, a atividade biocida de metabólitos de *S. tomento-alba* sobre biofilmes ainda não foi avaliada, sendo esse trabalho

também relevante nesse aspecto.

Achaetomium lippae, nova espécie de fungo endofítico de *L. gracilis* Schauer identificada, pertence ao pequeno gênero *Achaetomium*, que possui apenas quatro espécies: *A. globosum*, *A. luteum*, *A. strumarium* e *A. umbonatum* (Rodríguez *et al.*, 2004). São espécies que podem ser isoladas do solo e endofíticas, estando presente, principalmente, nas raízes de espécies de diferentes biomas (Ping *et al.*, 2016). Algumas propriedades biotecnológicas estão agregadas a esse gênero. Produção de enzimas para diferentes fins industriais (Tu *et al.*, 2015), como xilaneses e celulase, em específico (Zhao *et al.*, 2013; Bankole *et al.*, 2017), torna o gênero *Achaetomium* importante. E a possibilidade da obtenção de carboximetilcelulose (CMC) a partir do metabolismo de *A. lippae* agrega ainda mais valor, considerando que CMC é a matéria prima para a produção de biodiesel (Tolba *et al.*, 2017).

Já de *Clostridium* sp., único gênero de bactéria endofítica isolado da raiz de *L. gracilis* Schauer, o metabólito produzido agrega valores importantes dentro da indústria farmacêutica. Os grupos das cefalosporinas têm impacto direto na saúde por ser um dos antibióticos referência no combate a microrganismos multirresistentes (López-Hernández *et al.*, 2016). O gênero *Clostridium* é relativamente numeroso, incluindo algumas espécies que podem ser patogênicas em mamíferos (Udaondo *et al.*, 2017) e fermentativas, na sua maioria, pelo metabolismo anaeróbico, que podem gerar biogás (Kim *et al.*, 2016). Como endofíticas, algumas espécies estão presentes em culturas importantes, como arroz (Sun *et al.*, 2008) e milho (Jhonston-Monje & Raizada, 2011). Algumas espécies endofíticas de *Clostridium* podem produzir enzimas (Suto *et al.*, 2002), mas nenhuma foi descrita, até o momento, como associada à produção de antibióticos, principalmente do grupo das cefalosporinas.

3.2.1. Atividade biocida e antibiofouling sobre biofilmes de *Pseudomonas* sp., *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp.

A atividade biocida dos metabólitos obtidos dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer foi diferenciada entre si e em relação ao controle pelas técnicas empregadas. Dentre os metabólitos o único que demonstrou alguma atividade biocida sobre as cepas ATCC em biofilme foi o obtido de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1), inibindo significativamente o crescimento de *Pseudomonas* sp. e *Gallionella* sp. na concentração de 200µg/L após 96 e 48 horas de contato, respectivamente. Os resultados são dados pela relação OD580/OD600 (Fig. 3a). Não houve atividade significativa no tratamento de 150µg/L sobre os microrganismos avaliados por ambas as técnicas (Fig. 3b e 4b) como também nenhuma atividade sobre

Desulfovibrio sp, em ambos os tratamentos pela relação de absorvância.

Por outro lado, a partir da quantificação por MPN, houve redução na taxa de todos os microrganismos avaliados ao final do tempo de contato com 200µg/L do metabólito de *Clostridium* sp., sendo mais significativa também sobre *Pseudomonas* sp. e *Gallionella* sp. (Fig. 4a). A técnica de quantificação por MPN é mais precisa em relação à análise por absorvância devido ter a possibilidade de ser acompanhada claramente pela produção ou não de sulfeto, no caso das SBR (Rezende *et al.*, 2017). Todavia, deve ser utilizada como forma complementar de resultados, sustentando-os ou contrapondo-os (Bhagobaty, 2014).

Como houve atividade inibitória apenas sobre bactérias aeróbias pela metodologia de absorvância, a efetividade da ação biocida do metabólito de *Clostridium* sp. também foi verificada pela metodologia de semeadura *pour plate* na concentração de 200µg/L, demonstrando ter atividade, diferindo estatisticamente do controle (Fig. 5). A metodologia *pour plate* não foi utilizada para *Desulfovibrio* sp., tendo em vista a impossibilidade de crescimento pleno dessa espécie sobre meio sólido (Bhagobaty, 2014), o que inviabiliza a técnica. Micrografias eletrônicas dos biofilmes de cepas ATCC antes e após o contato com o metabólito de *Clostridium* sp., na máxima concentração (200µg/L), foram obtidas também para validar a ação antimicrobiana (Fig. 6).

De forma diferenciada os metabólitos obtidos de *S. tomento-alba* (LGS-Ff1) e *A. lippae* (LGS-Ff2) não tiveram atividade significativa sobre biofilmes das cepas ATCC nas concentrações avaliadas, não diferindo significativamente do controle pelas técnicas empregas (dados não mostrados). A natureza química dos metabólitos de *S. tomento-alba* e de *A. lippae*, ácido e carboidrato, respectivamente, podem contribuir, ao contrário de inibir, de forma positiva, para o crescimento, servindo como moléculas intermediárias ou diretamente fornecedoras de energia para o desenvolvimento da comunidade em biofilme (Güngör *et al.*, 2015), o que pode justificar, em parte, sua ineficiência nesse ensaio. Outro fator relevante é a concentração e os tipos microbianos avaliados (Lundin *et al.*, 2014).

De forma diferenciada o metabólito de *Clostridium* sp. apresentou propriedade antimicrobiana significativa sobre bactérias aeróbias e sobre *Desulfovibrio* sp. em biofilmes, pelas técnicas diferenciadas usadas. A atividade efetiva do metabólito de *Clostridium* sp. sobre o crescimento de *Pseudomonas* sp. vai de encontro a outros trabalhos, comprovando a atividade biocida do grupo das cefalosporina sobre esse gênero e sobre espécies multirresistentes (BĂLĂŞOIU *et al.*, 2014). O espectro de ação desse antibiótico abrange bactérias Gram positivas e negativas (Morata *et al.*, 2015) e seu efeito sobre biofilmes tem

sido demonstrado (Ding & He, 2010), principalmente de microrganismos patogênicos (Alan *et al.*, 2017). Porém, a efetividade da ação antimicrobiana sobre bactérias envolvidas no processo de corrosão microbiológica ainda não se tem relatos, possivelmente pelo custo benefício, já que a purificação de antibióticos demanda valor elevado (Wright, 2015).

As bactérias *Gallionella* sp. e *Pseudomonas* sp. foram as mais significativamente inibidas, demonstrando que o metabólito de *Clostridium* sp. age mais fortemente sobre microrganismos de metabolismo aeróbio. Provavelmente a posição que esse tipo microbiano ocupa dentro do biofilme, mais externamente (Videla, 2003), reflete o espectro de ação do metabólito, agindo mais superficialmente sobre a comunidade microbiana. A redução na taxa de *Desulfovibrio* sp. (Fig. 4a) pode ser reflexo do tempo de contato, o que pode proporcionar maior difusão do metabólito dentro do biofilme e, conseqüentemente, agir sobre esse tipo bacteriano, que se distribui mais internamente à comunidade (Enning & Garrelfs, 2013).

3.2.2. Atividade biocida sobre biofilmes de IOF, SBR e TAB

A atividade biocida dos metabólitos obtidos dos microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer foi diferenciada entre si e em relação ao controle pelas técnicas empregadas. Os metabólitos que demonstraram atividade biocida sobre os biofilmes de IOB, SBR e TAB foram os obtidos de *S. tomento-alba* (LGS-Ff1) e de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1), ambos na máxima concentração avaliada após 144 horas de contato. A Figura 7 mostra os resultados obtidos a partir da relação OD580/OD600.

O metabólito de *S. tomento-alba* agiu reduzindo significativamente a taxa de IOB e, em menor escala, a de SRB após 144 horas de contato (Fig. 7a), contrapondo os resultados da sua ação sobre biofilmes das cepas ATCC, onde não houve ação significativa de inibição. Já o metabólito de *Clostridium* sp. demonstrou também ter atividade sobre biofilmes, mas apenas sobre biofilmes de bactérias anaeróbias totais (TAB) nesse ensaio (Fig. 7b). As variações da atividade dos metabólitos sobre biofilmes de cepas ATCC e sobre biofilmes obtidos da água de produção de petróleo justifica-se pelo fato de haver nesses algumas espécies bacterianas mais vulneráveis a determinadas biocidas em relação a outras (Crespi, 2001), pois não há um único tipo de espécie purificada em comunidade de biofilme, mas há um grupo diverso dentro do mesmo gênero, com variações adaptativas e genéticas, em plena dinâmica (Poltak & Cooper, 2011). Outro importante fato é que biofilmes obtidos da água de produção de petróleo tendem a ser, naturalmente, mais resistente a ação de inibidores, sejam naturais ou não (Davies, 2003), em decorrência da simbiose entre as espécies, mantida, entre outros

efeitos, para neutralização dos biocidas (Companac *et al.*, 2002).

Os resultados da taxa de MPN vão de encontro aos obtidos pela relação de absorvância, mostrando também a ação inibitória dos metabólitos de *S. tomento-alba* e *Clostridium* sp. sobre IOB e SRB, e TAB, respectivamente, na máxima concentração avaliada após 144 horas de contato (Fig. 8). O metabólito de *S. tomento-alba* teve espectro de ação maior sobre as IOB, sendo eficiente, em menor escala, sobre SRB em biofilmes (Fig. 8a). Por outro lado, apenas as TAB foram inibidas por ação do metabólito de *Clostridium* sp., reduzindo sua taxa de crescimento a quase zero (Fig. 8b).

O metabólito obtido da bactéria endofítica *Clostridium* sp., isolada da raiz de *L. gracilis* Schauer, foi o mais eficiente na inibição de maioria dos biofilmes microbianos avaliados, diferindo significativamente do controle. A ação do metabólito de *S. tomento-alba* também demonstrou atividade exclusivamente sobre biofilmes de bactérias oxidantes de ferro e SRB. Desse modo, os metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer podem ser bastante efetivos como futuros biocidas naturais no controle da corrosão microbiologicamente induzida.

3.2.3. Atividade *antibiofouling*

A atividade *antibiofouling* foi verificada apenas pela ação do metabólito obtido de *S. tomento-alba* (LGS-Ff1) sobre a formação de biofilmes de SRB, IOF e TAB nos tempos de contato avaliados. A Figura 9 mostra micrografias eletrônicas obtidas após 144 horas de contato com cada metabólito na máxima concentração avaliada (200 µg/L) comparadas ao controle. A ausência da formação de biofilmes sobre a superfície do aço carbono AISI 1020 após 144 horas de tratamento com 200µg/L do metabólito obtido de *S. tomento-alba* deixa claro a atividade *antibiofouling* dessa substância (Fig. 9b) quando comparada ao controle (Fig. 9a) e aos biocupons tratados com os demais metabólitos (Fig. 9c e d).

A eficiência do metabólito de *S. tomento-alba* (LGS-Ff1) foi também comprovada pela obtenção das isotermas de adsorção, dada pelo modelo de Langmuir (Fig. 10). Os resultados da avaliação do metabólito LGS-Ff1 em diferentes concentrações se enquadraram no perfil de isoterma de Langmuir ($R^2=0,998$) (Fig. 10a), demonstrando que houve forte adsorção dessa substância sobre a superfície do aço carbono AISI 1020 nas condições de temperatura e pH avaliados ($\pm 30^\circ$ C e 6,0, respectivamente), diferindo de forma significativa da ação dos outros dois metabólitos, que não demonstraram ter atividade *antibiofouling* com base na isoterma de adsorção ($R^2 < 8,0$) (Fig. 10b e c).

Metabólitos obtidos a partir do metabolismo de microrganismos endofíticos podem

apresentar atividade *antibiofouling*, seja evitando a formação de macro ou *microfouling* (Proksch *et al.*, 2010). A adsorção do metabólito LGS-Ff1 sobre a superfície do aço carbono AISI 1020 pode justificar a ausência de formação de biofilme ao final do tempo de contato. Possivelmente, o metabólito de *S. tomento-alba* agiu de forma preventiva na formação de biofilmes de IOB, SRB e TAB devido sua adsorção à superfície do material, evitando assim a adesão das células microbianas e inviabilizando a formação de biofilme sobre a superfície do aço. A prevenção na adesão das células microbianas ocorreu possivelmente em decorrência das modificações estruturais ou no perfil de cargas elétricas da superfície (Rittschof, 2000) ou pela sua própria atividade biocida, anteriormente comprovada, eliminando assim as primeiras células a entrar em contato com o aço. A adesão das células microbianas é considerada um dos fatores mais importantes para a formação e desenvolvimento da comunidade microbiana em biofilme (Brambilla *et al.*, 2017).

Em oposição aos resultados da ação *antibiofouling* demonstrada pelo metabólito de *S. tomento-alba*, as outras substâncias obtidas do metabolismo de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer, *A. lippae* e *Clostridium* sp., não tiveram ação efetiva possivelmente em decorrência da baixa adsorção à superfície do material. A natureza química desses metabólitos, carboximetilcelulose (CMC) e cefalosporinas, tem perfil de adsorção diferenciado de acordo com o meio. As cefalosporinas apresentam boa adsorção em meio aquoso (Fakhri & Adami, 2014) assim como CMC (Trabelsi & Langevin, 2006). Porém, a baixa adsorção dessas moléculas sobre aço carbono AISI 1020 pode ter ocorrido pela natureza do meio, já que águas de produção de petróleo são ricas em matéria orgânica, substâncias químicas e de pH ácido (Chew *et al.*, 2017), o que pode interferir na propriedade de adsorção de algumas substâncias (Abdel-Aal *et al.*, 2016), como ocorre com CMC em fluidos de perfuração aquosos (Fagundes *et al.*, 2016).

4. Conclusões:

Diferentes tipos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer foram isolados, sendo identificados os principais gêneros: *Sordaria*, *Achaetomium* e *Clostridium*. Uma nova espécie de fungo endofítico, obtida da folha de *L. gracilis* Schauer, foi identificada como *Achaetomium lippae* e seu potencial de produção de carboximetilcelulose descoberto.

Os metabólitos obtidos a partir de microrganismos endofíticos isolados da folha e raiz de *L. gracilis* Schauer pertencem a diferentes classes químicas e demonstraram ter atividade biocida sobre biofilmes formados em aço carbono AISI 1020, diferenciando entre si.

Os biofilmes de *Pseudomonas* sp., *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp foram mais fortemente inibidos pelo metabólito obtido de *Clostridium* sp. na máxima concentração avaliada e ao final do tempo de contato. Já o metabólito que apresentou melhor atividade biocida sobre os biofilmes de bactérias redutoras de sulfato, oxidantes de ferro e anaeróbias totais foi de *S. tomento-alba*, também na maior concentração avaliada e após 144 horas de contato.

O único metabólito que demonstrou ter atividade *antibiofouling* foi o obtido de *S. tomento-alba*, sendo verificada sua ação na maior concentração avaliada, após 144 horas de contato. Os outros metabólitos não tiveram ação significativa nas concentrações e sobre os tempos avaliados.

Substâncias derivadas do metabolismo de microrganismos endofíticos isolados de *L. gracilis* Schauer tiveram ação biocida e *antibiofouling* comprovada sobre biofilmes de microrganismos envolvidos na corrosão microbiologicamente induzida. Esse potencial têm significativos impactos econômicos e ecológicos e o uso de tais substâncias em diferentes setores industriais, principalmente dentro da indústria de petróleo e gás, representa alternativa de novos biocidas e agentes *antibiofouling* de baixo custo, com ação efetiva e de baixo impacto ambiental.

5. Referências:

Abdel-Aal, H.K.; Aggour, M.A.; Fahim, M.A. Petroleum and gas field processing. 2ª ed. London: CRC Press, Taylor and Francis Group. 2016.

Aguilar-Trigueros, C.A.; Rilling, M.C. Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms. *Ecology and Evolution*, v. 6, p. 8149–8158, 2016. doi: 10.1002/ece3.2416.

Alan, R.N.; Kelso, M.J.; Rineh, A.; Yepuri, N.R.; Feelisch, M.; Soren, O.; Brito-Mutunayagam, S.; Salib, R.J. Cephalosporin-NO-donor prodrug PYRRO-C3D shows β -lactam-mediated activity against *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Nitric Oxide*, v. 65, p. 43–49, 2017. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.006.

Aminov, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, v. 133, n. 1, p. 4–19, 2017. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.001.

Arrieta, D.; Biol, L.; Leonardo, C.A.; Donicer, M.V. Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas aisladas de orégano serrano (*Lippia origanoides*) contra *Burkholderia glumae* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, v. 9, p. 93-98, 2017. doi: 10.24188/recia.v9.nS.2017.526.

Bankole, P.O.; Adekunle, A.A.; Obidi, O.F. Mycodecolorization of Reactive Red HE7B dye by *Achaetomium strumarium* and *Aspergillus flavus* and shelf life determination. *Journal*

Cogent Environmental Science, v. 3, n. 1, 2017. doi: 10.10802F23311843.2017.1278646.

BĂLĂȘOIU, M.; BĂLĂȘOIU, A.T.; MĂNESCU, R.; AVRAMESCU, C.; IONETE, A. *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods.

Brader, G.; Compant, S.; Mitter, B.; Trognitz, F.; Sessitsch, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 30-37, 2014. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.012.

Brambilla, E.; Ionescu, A.C.; Cazzaniga, G.; Ottobelli, M.; Mazzoni, A.; Cadenáro, M.; Gagliani, M.; Tay, F.R.; Pashley, D.H.; Breschi, L. *In vitro Streptococcus mutans* biofilm formation on surfaces of chlorhexidine-containing dentin bonding systems. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 75, p. 23–30, 2017. doi: 10.1016/j.ijadhadh.2017.02.013.

Batmanghelich, F.; Li, L.; Seo, Y. Influence of multispecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron. *Corrosion Science*, v. 121, p. 94-104, 2017. doi: 10.1016/j.corsci.2017.03.008.

Bhagobaty, R.K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 13, n. 1, p. 11–16, 2014. doi: 10.1007/s11157-014-9331-9.

Cai, L.; Jeewon, R.; Hyde, K.D. Phylogenetic investigations of Sordariaceae based on multiple gene sequences and morphology. *Mycological Research*, n. 110, p. 137-150, 2006. doi: 10.1016/j.mycres.2005.09.014.

Crespi, B.J. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 4, p. 178-183, 2001. doi:10.1016/S0169-5347(01)02115-2.

Current Health Sciences Journal, v. 40, n. 2, p. 85–92, 2014. doi: 10.12865/CHSJ.40.02.01.

Carpén, L.; Rajala, P.; Huttunen-Saarivirta, E.; Bomberg, M. Corrosion behavior of copper in simulated anoxic groundwater inoculated with sulfate reducing bacteria and methanogens. In *Corrosion 2017*. NACE International, 2017.

Carvalho, C.R.; Gonçalves, V.N.; Pereira, C.B.; Johann, S.; Galliza, I.V.; Alves, T.M.A.; Rabello, A.; Sobral, M.E.G.; Zani, C.L.; Rosa, C.A.; Rosa, L.H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, v. 57, n. 2, p. 95–107, 2012. doi: 10.1007/s13199-012-0182-2.

Clark, M.E.; Edelman, R.E.; Duley, M.L.; Wall, J.D.; Fields, M.W. Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon proteins filaments. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 2844–2854, 2007. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01398.x.

Chew, N.G.P.; Zhao, S.; Loh, C.H.; Permogorov, N.; Wang, R. Surfactant effects on water recovery from produced water via direct-contact membrane distillation. *Journal of Membrane Science*, v. 528, p. 126–134, 2017. doi: 10.1016/j.memsci.2017.01.024.

Campanac, C.; Pineau, L.; Payard, A.; Baziard-Mouysset, G.; Roques, C. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 5, p. 1469-1474, 2002. doi: 10.1128/AAC.46.5.1469-1474.2002.

Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 114-122, 2003. doi:10.1038/nrd1008.

Demain, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999. doi: 10.1007/s002530051546.

Ding, C.; He, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 925-941, 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2649-5.

Djengue, H.W.; Dansi, A.; Adjatin, A.; Dossou-Aminon, I.; Dansi, M.; Sanni, A. Ethnobotanical investigation of *Lippia multiflora* molkenke, a local aromatic leafy vegetable under domestication in benin. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, v. 4, n. 5, p. 44-51, 2017. doi: 10.20546/ijcrbp.2017.405.005.

El-Etre, A.Y.; Ali, A.I. A novel green inhibitor for C-steel corrosion in 2.0 mol·L⁻¹ hydrochloric acid solution. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 25, n. 3, p. 373-380, 2017. doi: 10.1016/j.cjche.2016.08.017.

Enning, D.; Garrelfs, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied Environmental Microbiology*, v. 80, n. 4, p. 1226-1236, 2013. doi:10.1128/AEM.02848-13.

Fadl-allah, S.A.; Montaser, A.A.; Sanaa, M.F.; El-Rab, G. Biocorrosion control of electroless Ni-Zn-P coating based on carbon steel by the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *International Journal Electrochemistry Science*, v. 11, p. 5490-5506, 2016. doi: 10.20964/2016.07.96.

Fagundes, K.R.S.; Fagundes, F.P.; Balaban, R.C. Correlação entre propriedades físico-químicas da carboximetilcelulose e do carbonato de cálcio no desempenho de fluidos de perfuração aquosos. *Runpetro*, v. 4, n. 1, p. 17-29, 2016.

Fakhri, A.; Adami, S. Adsorption and thermodynamic study of Cephalosporins antibiotics from aqueous solution onto MgO nanoparticles. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 45, n. 3, p. 1001-1006, 2014. doi: 10.1016/j.jtice.2013.09.028.

Ferreira, T.P.S.; Santos, G.R.; Soares, I.M.; Ascêncio, S.D.; Alvim, T.C.; Siqueira, A.C.; Aguiar, R.W.S. Secondary metabolites from endophytic fungus from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 11, n. 16, p. 296-306, 2017. doi: 10.5897/JMPR2017.6371.

GenBank. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em Janeiro de 2017.

Geoffrey, S. A guide to developing a biofouling management plan. *Marine Technology Society Journal*, v. 51, n. 2, p. 105-110(6), 2017. doi: 10.4031/MTSJ.51.2.6.

Güngör, N.D.; Çotuk, A.; Ilhan-Sungur, E.; Cansever, N. Effect of mixed-species biofilm on copper surfaces in cooling water system. *Journal of Materials Engineering and Performance*, v. 24, n. 2, p. 848–858, 2015. doi: 10.1007/s11665-014-1332-x.

Haile, T.; Teevens, P.; Zhenjin, Z. Sulphate-reducing bacteria growth kinetics'-based microbiologically influenced corrosion predictive model. *Journal of Pipeline Engineering*, v. 14, n. 4, p. 259-267, 2015.

Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Joseph, H.; Bailleul, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.044.

Isotahdon, E. Corrosion Losses, Mechanisms and Protection Strategies for Sintered Nd-Fe-B Magnets. Finland: Tampere University of Technology, v. 1459, 2017.

Johnston-Monje, D.; Raizada, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *Plos One*, v. 6, n. 6, p. 1-22, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0020396.

Kahrilas, G.A.; Blotevogel, J.; Stewart, P.S.; Borch, T. Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. *Environmental Science Technology*, v. 49, n. 1, p. 16–32, 2015. doi: 10.1021/es503724k.

Kim, D. Jung, S.; Sohn, J.; Kim, H.; Lee, S. Biocide application for controlling biofouling of SWRO membranes — an overview. *Desalination*, v. 238, n. 1–3, p. 43-52, 2009. doi: 10.1016/j.desal.2008.01.034.

Kim, M.; Kim, K-Y.; Lee, K.M.; Youn, S.H.; Lee, S-M.; Woo, H.M.; Oh, M-K.; Um, Y. Butyric acid production from softwood hydrolysate by acetate-consuming *Clostridium* sp. S1 with high butyric acid yield and selectivity. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 1208-1214, 2016. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.073.

Lacerda, J.R.M.; Silva1, T.F.; Vollú, R.E.; Marques, J.M.; Seldin, L. Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with *Lippia sidoides* Cham. are able to solubilize/mineralize phosphate. *SpringerPlus*, v. 5, n. 828, p. 1-7, 2016. doi: 10.1186/s40064-016-2596-4.

Liengen, T.; Féron, D.; Basséguy, R.; Beech, I.B. Understanding biocorrosion: Fundamentals and applications, v. 66. Cambridge: Elsevier publications, 2014.

López-Hernández, I.; Alonso, N.; Fernández-Martínez, M.; Zamorano, L. Rivera, A.; Oliver, A.; Canejo, M.C.; Martínez-Martínez, L.; Navarro, F.; Pascual, A. Activity of ceftazidime–avibactam against multidrug-resistance *Enterobacteriaceae* expressing combined mechanisms of resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2016. doi: 10.1016/j.eimc.2016.09.013.

Loro, M.; Valero-Jiménez, C.A.; Nozawa, S.; Márquez, L.M. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environments*, v. 85, p. 46-55, 2012. doi: 10.1016/j.jaridenv.2012.04.009.

Loto, C.A. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact—a review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, p. 1-12, 2017. doi: 10.1007/s00170-017-0494-8.

Ludin, J.G.; Coneski, P.N.; Fulmer, P.A.; Wynne, J.H. Relationship between surface concentration of amphiphilic quaternary ammonium biocides in electrospun polymer fibers and biocidal activity. *Reactive and Functional Polymers*, v. 77, p. 39-46, 2014. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.02.004.

Morata, L.; Mensa, J.; Soriano, A. New antibiotics against gram-positives: present and future indications. *Current Opinion in Pharmacology*, n. 24, p. 45-51, 2015.

Moreno, D.A.; Ibars, J.R.; Beech, I.B.; Gaylarde, C.C. Biofilm formation on mild steel coupons by *Pseudomonas* and *Desulfovibrio*. *Biofouling*, v. 7, n. 2, p. 129-139, 1993. doi: 10.1080/08927019309386248.

Mousa, W.K.; Raizada, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, n. 65, p. 1-18, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00065.

NACE/ASTM-TM0169 (G0031 12A). Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. Edition 2012. 10p.

Nair, D.N.; Padmavathy, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-14, 2014. doi: 10.1155/2014/250693.

Poltak, S.R.; Cooper, V.S. Ecological succession in long-term experimentally evolved biofilms produces synergistic communities. *The ISME Journal*, v. 5, p. 369–378, 2011. doi: 10.1038/ismej.2010.136.

Postgate, J.R.; Kent, H.M. Robson, R.L.; Chesshyre, J.A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *D. vulgaris*. *Microbiology*, v. 130, p. 1597-1601, 1984. doi: 10.1099/00221287-130-7-1597.

Ping, Z.; Xia, W.; Lei, C.; Omer, S.H.S.; Zhang, X.; Zhuang, Y.; Chen, S. Isolation, identification and physiological activity of endophytes from the roots of *Vitis vinifera*. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, v. 8, n. 6, p. 532-538, 2016. doi: 10.1166/nnl.2016.2164.

Proksch, P.; Putz, A.; Ortlepp, S.; Kjer, J.; Bayer, M. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, n. 4, p. 475–489, 2010. doi: 10.1007/s11101-010-9178-9.

Qian, P-Y.; Xu, Y.; Fusetani, N. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling*, v. 26, n. 2, p. 223-234, 2009. doi: 10.1080/08927010903470815.

Rezende, J.R.; Hubertb, C.R.J.; Røya, H.; Kjeldsena, K.U.; Jørgensen, B.B. Estimating the abundance of endospores of sulfate-reducing bacteria in environmental samples by inducing

germination and exponential growth. *Geomicrobiology*, v. 34, n. 4, p. 338-345, 2017. doi: 10.1080/01490451.2016.1190805.

Rittschof, D. Natural product antifoulants: One perspective on the challenges related to coatings development. *Biofouling*, v. 15, n. 1-3, p. 119-127, 2000. doi: 10.1080/08927010009386303.

Rodríguez, K.; Stchigel, A.M.; Cano, J.F.; Guarro, J. A new species of *Achaetomium* from Indian soil. *Studies in Microbiology*, v. 50, p. 77-82, 2004.

Rosa, J.P.; Tibúrcio, S.R.G.; Marques, J.M.; Seldin, L.; Coelho, R.R.R. *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 4, n. 7, p. 603–609, 2016. doi: 10.1016/j.bjm.2016.04.013.

Sánchez, A.; Stams, A.J.M.; Hedrich, S.; Nancucheo, I.; Johnson, D.B. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles*, v. 19, p. 39–47, 2015. doi: 10.1007/s00792-014-0701-6.

Silva, T.F.; Vollú, R.E.; Jurelevicius, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Blank, A.F.; Seldin, L. Does the essential oil *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect in endophytic microbial community? *BMC Microbiology*, v. 13, n. 29, p. 1-14, 2013. doi: 1471-2180/13/29.

Silva, V.C.; Rodrigues, C.M. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 14, p. 1-6, 2014. doi: 10.1186/s40538-014-0014-0.

Siqueira, V.M.; Conti, R.; Araújo, J.M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2012. doi:10.1007/s13199-011-0113-7.

Strobel, G.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their Natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

Suto, M.; Takebayashi, M.; Saito, K.; Tanaka, M.; Yokota, A.; Tomita, F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80059-7.

Sun, L.; Qiu, F.; Zhang, X. *Microbiology Ecology*, v. 55, n. 3, p. 415-424, 2008. doi:10.1007/s00248-007-9287-1.

Teichert, I. Nuclear dynamics during ascospore germination in *Sordaria macrospora*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 98, p. 20–22, 2017. doi: 10.1016/j.fgb.2016.11.004.

Tejesvi, M.V.; Kajula, M.; Mattila, S.; Pirttilä, A.M. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, v. 47, p. 97–107, 2011. doi: 10.1007/s13225-010-0087-4.

Tolba, A.A.; Mohamady, S.I.; Hussin, S.S.; Akashi, T.; Sakai, Y.; Galhoum, A.A.; Guibal, E. Synthesis and characterization of poly(carboxymethyl)-cellulose for enhanced La(III)

sorption. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1809–1820, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.064.

Trabelsi, S.; Langevin, D. Co-adsorption of carboxymethyl-cellulose and cationic surfactants at the air–water interface. *Langmuir*, v. 23, n. 3, p. 1248–1252, 2006. doi: 10.1021/la062296d.

Tu, T.; Luo, H.; Meng, K.; Cheng, Y.; Ma, R.; Shi, P.; Huang, H.; Bai, Y.; Wang, Y.; Zhang, L.; Yao, B. Improvement in thermostability of an *Achaetomium* sp. strain Xz8 endopolygalacturonase via the optimization of charge-charge interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 6938–6944, 2015. doi:10.1128/AEM.01363-15.

Udaondo, Z.; Duque, E.; Ramos, J-L. The pangenome of the genus *Clostridium*. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.13732.

Venzlaff, H.; Enning, D.; Srinivasan, J.; Mayrhofer, K.J.J.; Hassel, A.W.; Widdel, F.; Stratmann, M. Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corrosion Science*, v. 66, p. 88–96, 2013. doi: 10.1016/j.corsci.2012.09.006.

Vogel, H.J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The American Naturalist*, v. 98, n. 903, 435-446, 1964. doi: 10.1086/282338.

Xu, D.; Jia, R.; Li, Y.; Gu, T. Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 97, 2017. doi: 10.1007/s11274-016-2203-4.

Zhao, L.; Meng, K.; Shi, P.; Bai, Y.; Luo, H.; Huang, H.; Wang, Y.; Yang, P.; Yao, B. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 1879–1885, 2013. doi: 10.1016/j.procbio.2013.08.020.

Wright, G. Antibiotics: An irresistible newcomer. *Nature*, v. 517, p. 442–444, 2015. doi:10.1038/nature14193.

Figuras:

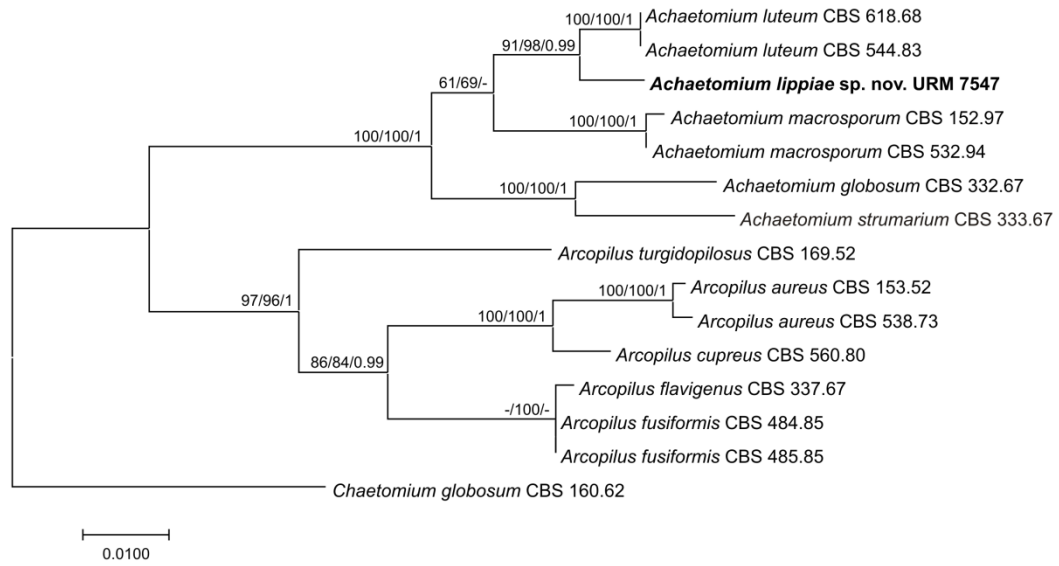
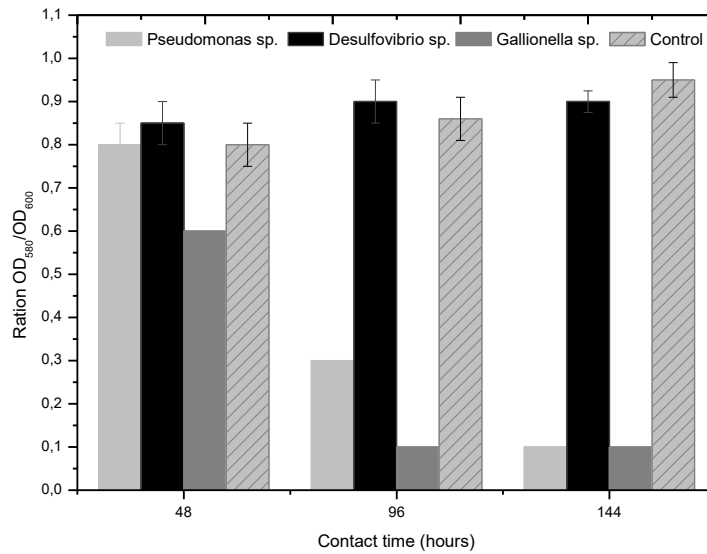
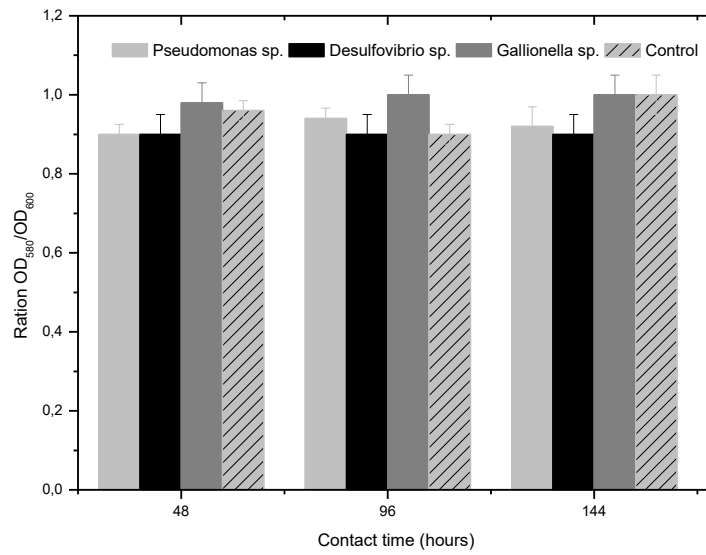


Figura 1: Árvore filogenética mostrando a relação de proximidade entre *A. lippiae* e *A. luteum* a partir do sequenciamento genético.

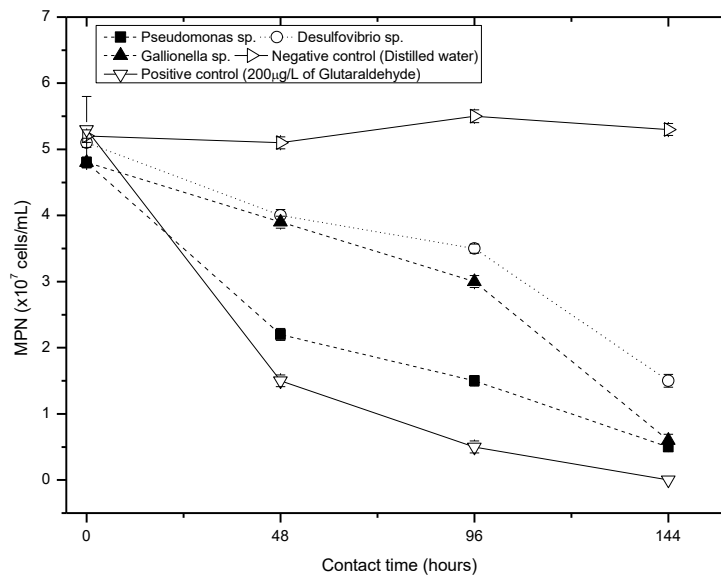


(a)

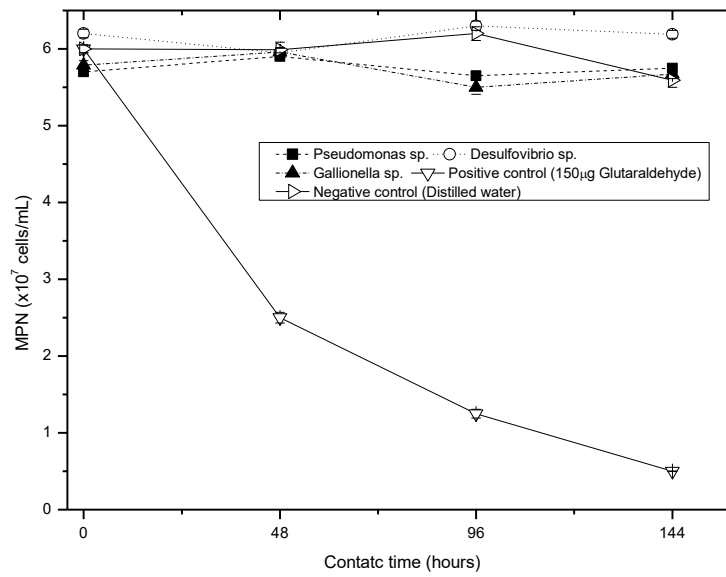


(b)

Figura 2: Quantificação de cristal de violeta retido nos biofilmes microbianos de *Pseudomonas* sp., *Desulfovibrio* sp. e *Gallionella* sp. sobre aço carbono AISI 1020 após diferentes tempos de contato com (a) 200 e (b) 150 µg/L do metabólito de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1). Os valores são expressos pela razão de densidade óptica 580/600nm.



(a)



(b)

Figura 3: Número mais provável (NMP) de bactérias após diferentes tempos de contato com (a) 200 e (b) 150 µg/L do metabólito de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1).

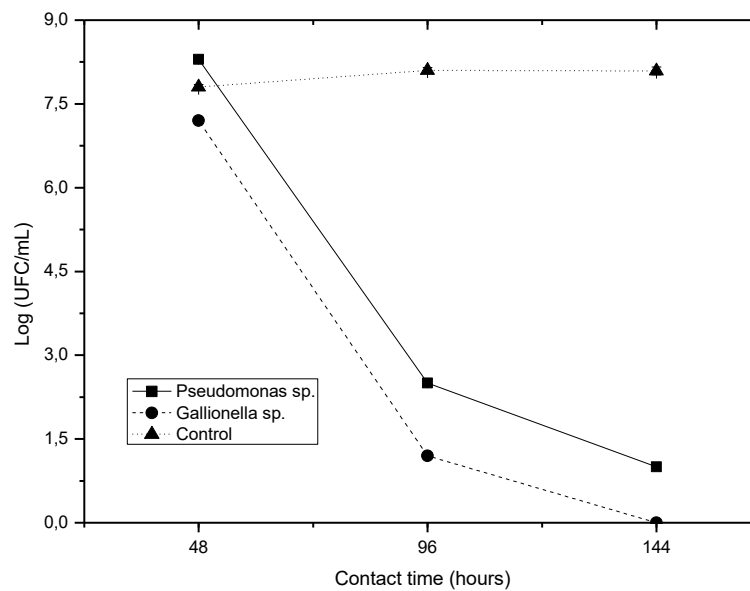


Figura 4: Quantificação de *Pseudomonas* sp e *Gallionella* sp. pelo método *pour plate* após contato com 200 µg/L do metabólito de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1).

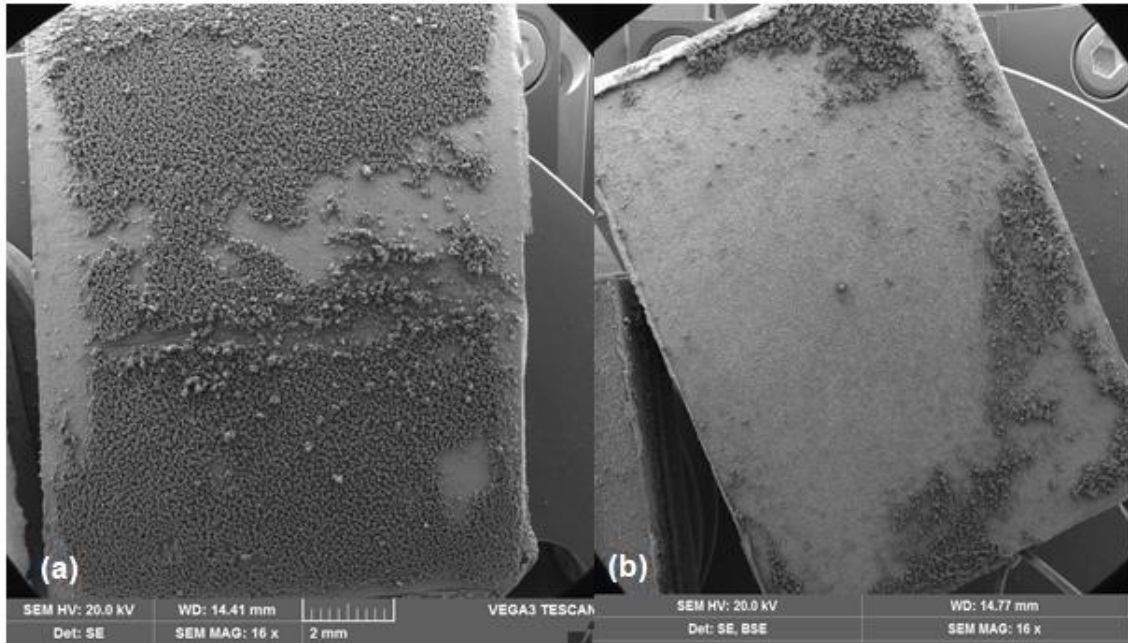
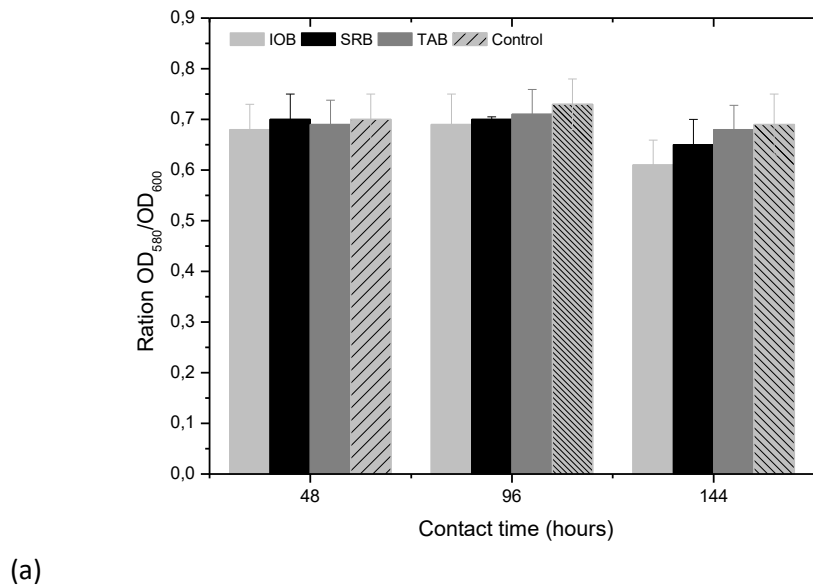
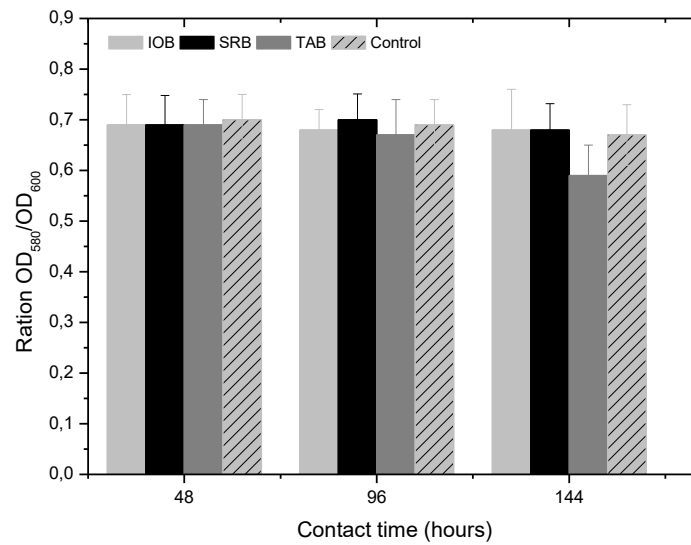


Figura 5: Micrografias eletrônicas de biofilmes microbianos sobre biocupons de aço carbono AISI 1020 (a) antes e (b) após 144 horas de contato com 200 $\mu\text{g/L}$ do metabólito de *Clostridium* sp.





(b)

Figura 6: Quantificação de cristal de violeta retido nos biofilmes microbianos de bactérias oxidantes de ferro (IOB), redutoras de sulfato (SRB) e anaeróbias totais (TAB) sobre aço carbono AISI 1020 após diferentes tempos de contato com (a) 200 µg/L do metabólito de *S. tomento-alba* sp. (LGS-Ff1) e (b) do metabólito de *Clostridium* sp. (LGS-Rb1). Os valores são expressos pela razão de densidade óptica 580/600nm.

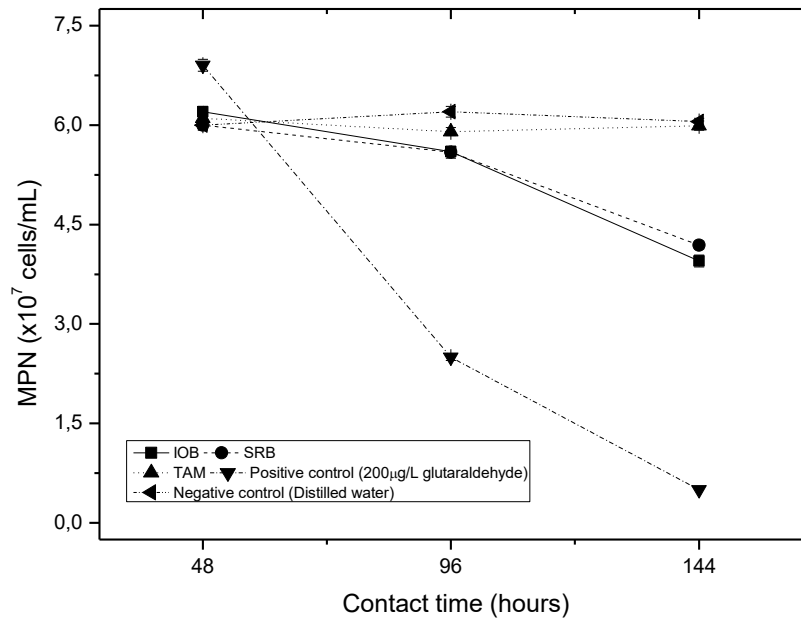


Figura 7: Número mais provável (NMP) de bactérias oxidantes de ferro (IOB), redutoras de sulfato (SBR) e anaeróbias totais (TAB) sobre aço carbono AISI 1020 após diferentes tempos de contato com 200 μ g/L do metabólito de *S. tomento-alba* sp. (LGS-Ff1).

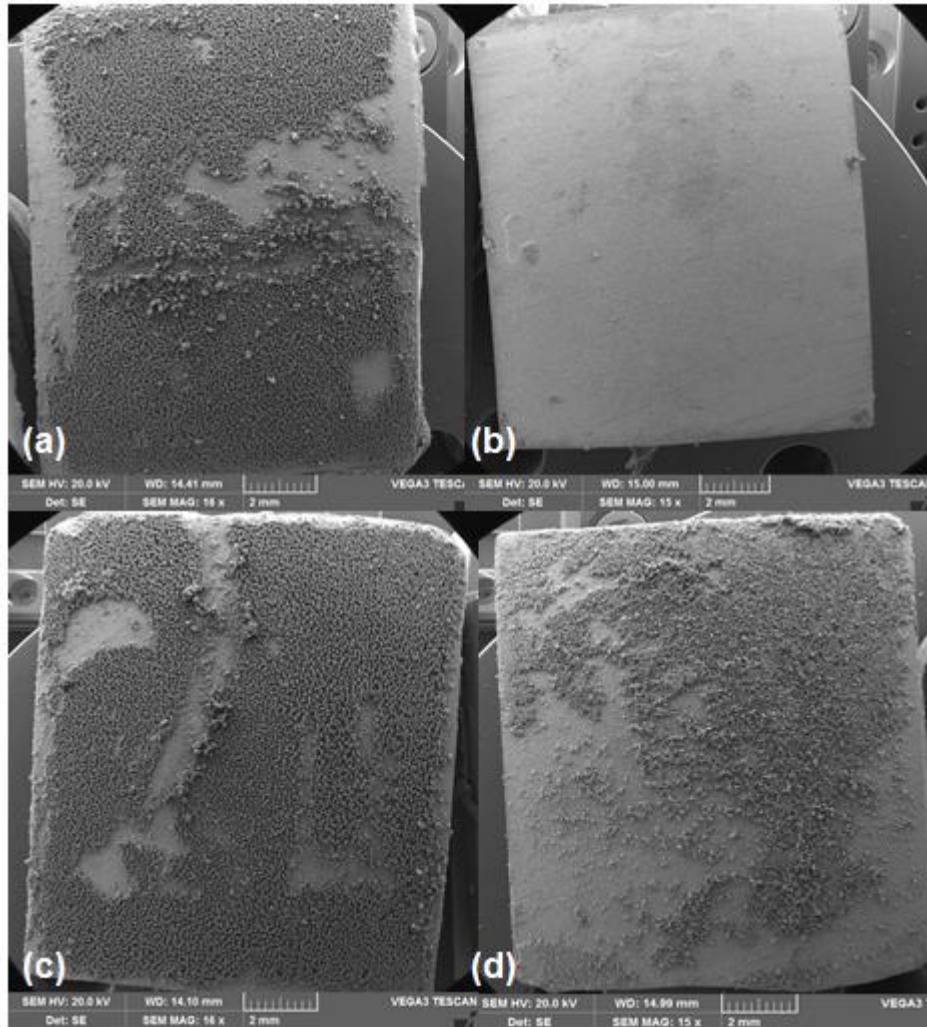
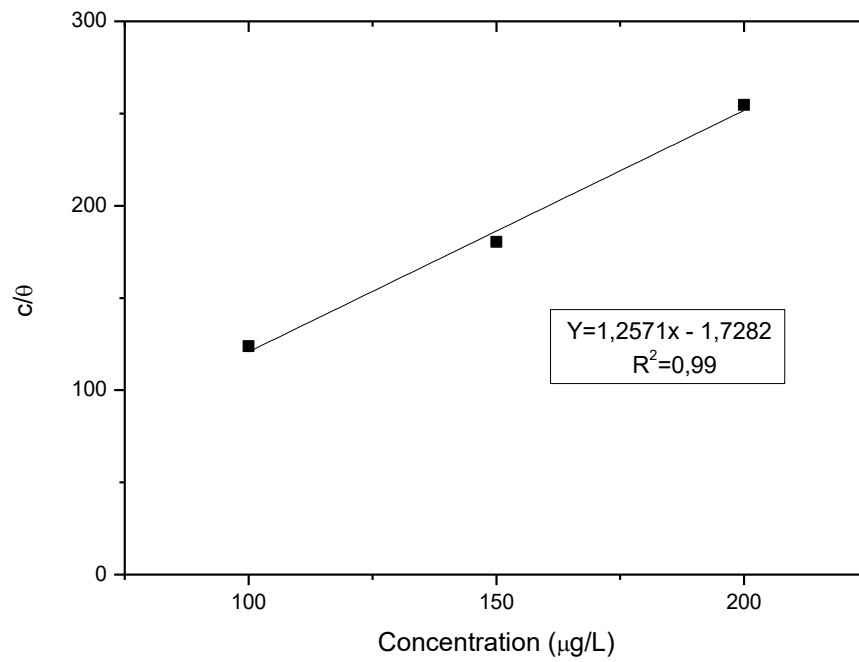
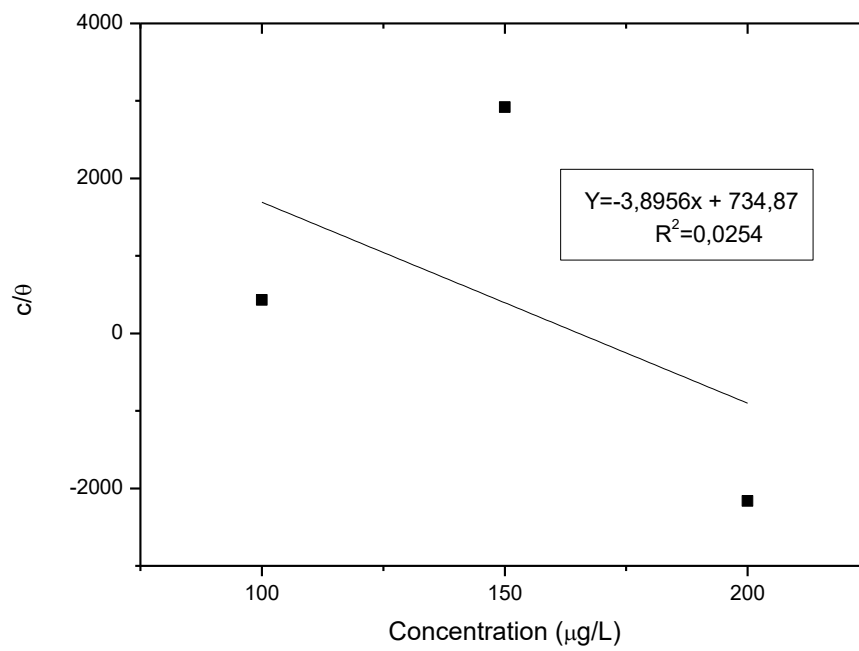


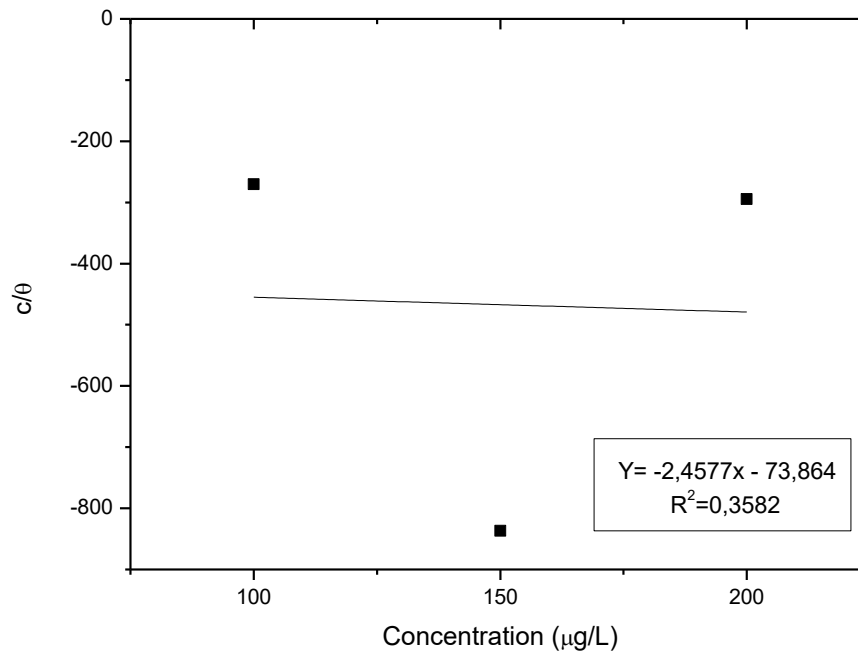
Figura 8: Micrografias eletrônicas mostrando a atividade *antibiofouling*: (a) controle, (b) ação do metabólito de *S. tomento-alba*, (c) *A. lippae* e (d) *Clostridium* sp. após 144 horas de contato na máxima concentração avaliada (200 μ g/L).



(a)



(b)



(c)

Figura 9: Isothermas de adsorção obtidas pelo modelo de Langmuir a partir de diferentes concentrações dos metabólitos de microrganismos endofíticos de *L. gracilis* Schauer após 144 horas de contato: (a) metabólito de *S. tomento-alba*, (b) metabólito de *A. lippae* e de (c) *Clostridium* sp.

6.4. Manuscrito IV:

Comprovante de submissão do manuscrito à *MicrobiologyOpen*:

The screenshot shows the 'Author Dashboard' for MicrobiologyOpen. On the left, a sidebar menu includes 'Submitted Manuscripts', 'Start New Submission', 'Legacy Instructions', '5 Most Recent E-mails', and 'English Language Editing Service'. The main content area is titled 'Submitted Manuscripts' and contains a table with the following data:

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EIC: Not Assigned ADM: Not Assigned	Draft (EMI-2017-1151)	Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer on <i>Clostridium bifermentans</i> and fungal-containing biofilms	27-Jul-2017	
<ul style="list-style-type: none"> Transferred In 		View Submission Cover Letter		

At the bottom of the page, the footer includes the ScholarOne and Thomson Reuters logos, copyright information for 2017, and a Windows taskbar showing the time as 16:21 on 27/07/2017.

1 **Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oil of *Lippia gracilis***
2 **Schauer on *Clostridium bifermentans* and fungal-containing biofilms**

3
4 Marcelino Gevilbergue Viana^{1*}, Márcia Tereza Soares Lutterbach², Djalma Ribeiro da Silva³, Cynthia
5 Cavalcanti de Albuquerque⁴, Francisco Josiel Nascimento dos Santos⁵, Everaldo Silvino dos Santos¹

6
7 ¹Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Brasil.

8 ²Instituto Nacional de Tecnologia – INT, Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação – LABIO, Rio de Janeiro
9 – RJ, Brasil.

10 ³Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo, Universidade Federal do Rio Grande do
11 Norte – UFRN, Brasil.

12 ⁴Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas – DCB, Universidade do
13 Estado do Rio Grande do Norte – UERN, Brasil.

14 ⁵Laboratório de Química Geral – Departamento de Engenharia Química – DEQ, Universidade Federal Rural do
15 Semiárido – UFERSA, Brasil.

16
17
18 **Abstract**

19 In oil industry microbiologically influenced corrosion plays a key role since it costs a lot of
20 money yearly. This kind of corrosion is mainly induced by the microbial biofilms occurring
21 on the metal surface and their metabolites that modify the electrochemical conditions from
22 metal-solution interface. This study focused on the evaluation of the antimicrobial activity of
23 essential oil of *Lippia gracilis* Schauer over *Clostridium bifermentans* isolated from ballast of
24 ship transporter of crude oil as well as against fungi occurring on microbial biofilms.
25 Additionally, it was evaluated the influence of the essential oil on the corrosion of AISI 1020
26 carbon steel by electrochemical and gravimetric techniques. A minimum inhibitory
27 concentration of the 20.0 µg.L⁻¹ was obtained for the essential oil over the *C. bifermentans*
28 that was the same used for investigating the biocide activity against fungal biofilms for
29 different contact time. Results showed that colony former unit (CFU) for fungi reduced to
30 zero after 120 minutes exposition to the essential oil. Also, the essential oil of *L. gracilis*
31 Schauer showed a quite good potential to control effectively the growth of *C. bifermentans*.
32 Electrochemical polarization and gravimetry assays showed that essential oil of *L. gracilis*
33 Schauer at concentration of 60µg.L⁻¹ was efficient to inhibit the corrosion of AISI 1020
34 carbon steel. *L. gracilis* Schauer essential oil acted as a powerful biocide.

35
36 **Keywords:** microbiologically influenced corrosion; essential oil; *Lippia gracilis* Schauer;
37 biocide; biofilm.

38 1. Introduction

39 In oil industry microbiologically influenced corrosion (MIC) plays a key role since it
40 costs a lot of money yearly accounting for up to 20% of total corrosion. The financial loss in
41 the USA can achieve values as high as 60 billion dollars per year (Videla & Herrera, 2009).
42 There is no official data about the financial loss caused by MIC in Brazil on the oil and gas
43 industry, however it certainly plays a role since this country shows climatic conditions
44 favorable to development of biofilms on the surface of materials immersed in natural water,
45 not necessarily marine water (Gu, 2012). However, it estimates that Brazilian financial loss
46 can accounts for approximately 10 billion dollars per year, mainly due to oil companies
47 (Lieser & Stek, 2010). MIC on the oil industry can affected many activities such as extraction,
48 processing, distribution as well as storage of oil.

49 It is known that many different types of microorganisms can be involved on the MIC
50 process mainly those in the planktonic or growing in sessile microbial communities called
51 biofilms. The bacteria *C. bifermentans* stands for favoring the corrosion by itself or for
52 making part of biofilms associated or not to others microorganisms such as fungi, for
53 instance. Therefore, *C. bifermentans* has been associated to MIC on production and industrial
54 treatment of water, also in pipeline of fields of oil and gas (Magot, 2000; Jan-Roblero et al.,
55 2008; Khelifi et al., 2009; Duque et al., 2011) *C. bifermentans* is an aerobic facultative,
56 motile, Gram-positive bacterium and can be isolated and grown on solid nutrient medium
57 (Barloy et al., 1996). Bacterium belonging to the *Clostridium* genus is able to produce
58 solvents and organic acids. These acids can then hasten the corrosion process and this fact can
59 be associated with favoring corrosion by the species belonging to this genus (Larsen et al.,
60 1988). Additionally, fungi occurring on biofilms can produce these organic acids then causing
61 problems to the oil and gas industry (Little & Lee, 2007). Some species of fungi can be easily
62 isolated from pipeline being these species *Hormoconis*, *Aspergillus*, *Fusarium* and
63 *Trichosporon* the most present.

64 Chemicals (organic or inorganic) used in order to reduce or eliminate the
65 microorganisms in industrial systems are called as biocides. They have been widely used in
66 the oil industry to protect pipeline during oil process steps such as, for instance, on drilling
67 fluids in production water and so on in order to control the planktonic microorganisms and,
68 mainly, those building biofilms.

69 Nowadays the biocides most used to control of *C. bifermentans* and fungi, as well as
70 the consequent corrosion caused by these microorganisms, are the hydrogen peroxide,

71 quaternary ammonium compounds and glutaraldehyde (Magot, 2000). However, many factors
72 can interfere on action of these biocides as, for instance, the endospores production,
73 inactivation mechanism of these substances and the development of resistance due to
74 mutations (Lanneluc et al., 2015). Another negative point of using chemical as biocides is its
75 toxicity to the environment, since it usually has lower degradability rate then increasing the
76 residence time in the environment (Gu, 2014).

77 In this context, the use of natural products as an alternative to the chemical biocides is
78 gathering attention due economical and environmental reasons. They show interesting
79 properties as sustainability, lower cost and are environmentally-friendly. The genus *Lippia* is
80 known to show anti-bacterial activity. *Lippia gracilis* Schauer is a native bush from semiarid
81 area of the Northeast region in Brazil, mainly at Pernambuco and Rio Grande do Norte States
82 (Mattos et al., 1999; Marreto et al., 2008). This specie has fruits with seeds that rarely
83 germinate and small and aromatic leaves rich in essential oils. The *L. gracilis* Schauer
84 essential oil is rich in substances such as thymol, carvacrol, p-cymene and γ -terpinene that
85 give to the oil powerful anti-microbial activities. Brazilian Healthy Ministry through the
86 Research Program on Medicinal Plant cites *L. gracilis* Schauer as one of the most important
87 plants (Pimenta et al., 2007). Many studies report the anti-microbial activity of the essential
88 oil from *L. gracilis* Schauer (Albuquerque et al., 2006; Oliveira et al., 2008). However, to the
89 best of our knowledge there is no report dealing with evaluation of this oil aiming to control
90 MIC.

91 In this context, this study investigated the anti-microbial potential of the essential oil
92 from *L. gracilis* Schauer over *C. bifermentans*, isolated from ballast of ship transporter of
93 crude oil and against fungi occurring on microbial biofilms. Additionally, the influence of the
94 essential oil on the corrosion of AISI 1020 carbon steel by electrochemical and gravimetric
95 techniques was also investigated.

96

97 **2 – Material and methods**

98 **2.1 - Harvest of *L. gracilis* Schauer and essential oil extraction**

99 The harvest of *L. gracilis* Schauer was carried out in the city of Mossoró (5° 11' 17"
100 south and 37° 20' 39" North) at semiarid region of Rio Grande do Norte State - Brazil.
101 Taxonomic identification was performed comparing harvested samples to one present as an
102 exsiccatae at herbarium from Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE/Brazil) also a
103 taxonomic key has been performed.

104 The essential oil was extracted using the hydrodistillation method by using *Clevenger*
105 system adapted to a glass ballon-flask. The yield was calculated by the difference between the
106 total oil quantity obtained and the total mass of dried leaves used during extraction.

107

108 **2.2 . Chemical characterization of the *L. gracilis* Schauer essential oil**

109 Samples of *L. gracilis* Schauer essential oil were assayed by Gas chromatography-
110 mass spectrometry (GC-MS) in order to identify its components. Firstly, a search on the CG-
111 MS library was performed in order to compare to the retention index of those obtained by the
112 co-injection of the oil together the linear hydrocarbons (C_{11} - C_{24}) calculated according to the
113 Van & Kratz (1963) equation. Followed, the results were compared to others CG-MS libraries
114 as well as with other studies on the literature. Also, a qualitative assay was performed by
115 using the Hewllet-Packard 5890 SERIES II CG chromatographer coupled to a flame
116 ionization detector (FID) and a capillary silica column (J & W Scientific DB-5). Column
117 temperature was adjusted to 35 °C and hydrogen (H_2) gas was used as carrier. The oil assay
118 was performed using the Hewllet-Packard CG/MS (CG: 5890 SERIES II/ CG-MS: MSD
119 5971) system coupled to the same column and temperature above mentioned. However, the
120 H_2 gas was changed to Helium (He) having a flow-rate of 1.0 mL/min.

121

122 **2.3. Isolation and identification of *C. bifermentans***

123 The isolation of *C. bifermentans* was performed in laminar flow hood from totak
124 microbial biofilms obtained using crude oil samples of ballast of ship transporter donated by
125 Center for Research and Development Leopoldo Américo Miguez de Melo (CENPES –
126 PETROBRAS - Rio de Janeiro, Brazil). The biocupons (1020 AISI carbon steel) were
127 inserted in a dynamic system made from acrylic with forced water circulation (flowrate: 500.0
128 mL/h) for obtaining the total microbial biofilms. Before insertion in the dynamic system, the
129 biocoupons were treated using sonication (UltraCleaner 1600A® - Skymen) using
130 dichloroethylene (by 15 minutes) followed by washing with etanol, acetone and deionized
131 water in order to remove residues and impurities. After seven days in the dynamic system the
132 biocoupon pickling was performed. The microorganisms existing at the biofilms for every
133 biocoupon were kept separately on Petri plates after pickling. It was used five biocoupons in
134 this assay.

135 After pickling the microorganisms existing on the Petri plate were transferred to
136 approximately 10 mL added to rounded bottom-flasks containing the cultivation medium

137 specific to total aerobic bacteria: Nutrient broth (10.0 g/L of *Lab-Lemco Powder*, 10.0 g/L of
138 peptone and 5.0g/L of NaCl) and incubated in BOD at 30 °C for 48 hours. Followed, samples
139 were transferred to plates of Petri containing the Agar nutrient medium for selecting the pure
140 colonies. Molecular identification of bacteria was carried out after 48 h of cultivation growth.
141 In this case, gene sequencing of 16S rRNA subunit was performed and further compared to
142 the DNA and proteins sequencing in data bank, *Genbank* (2000). Briefly, the DNA extraction
143 during the bacterial cultivation was performed and visualized through 1.0 % agarose gel
144 electrophoresis and marked by SYBR Safe® (Thermo Fischer Scientific). After DNA
145 extraction the 16S rRNA (1500pb) was amplified by PCR using universal *primers* for
146 bacterium, SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') and S17rev (5'-
147 GTTACCTTGTTACGACTT-3'). The amplification reactions were carried out using the
148 GeneAmp PCR System 9700® thermocycler (*Applied Biosystems*). The PCR products were
149 purified using the UltraClean® PCR Clean-up® kit (MOBio). After purification,
150 quantification and purity were estimated by optic density using NanoDrop® ND-1000 UV-
151 Vis spectrophotometer (*ThermoScientific*). PCR products were sent to sequencing at Human
152 Genomic Center at São Paulo University (USP-Brazil) using the MEGABACE 1000
153 automated sequencer. The sequencing result was assayed using the *Chromas Lite* software
154 version 2.01 (*Technelysium*) and compared to those existing in the *Genbank* (2000). The
155 sequence similarity was performed using the BLASTn (*Basic Alignment Search Tool*)
156 software.

157

158 **2.4. Activity of *L. gracilis* Schauer essential oil over *C. bifermentans***

159 In order to determine the minimum inhibitory concentration of *L. gracilis* Schauer
160 essential oil different concentrations were added to the cultivation medium. Next, samples of
161 the *C. bifermentans* obtained from biofilms were added to the solid medium on the Petri
162 plates and incubated in Biochemical Oxygen Demand (BOD) equipment at 30°C for 24 hours.
163 The following concentrations were assayed 0.5; 1.0; 10.0; 30.0; 60.0 and 90.0 µg with four
164 repetitions. A blank was used as control and results were obtained after 24 hours.

165

166 **2.5. Activity of *L. gracilis* Schauer essential oil in fungal biofilms**

167 To obtain the fungal-containing biofilms in order to assay the biocide activity of the *L.*
168 *gracilis* Schauer the experiments were carried out in dynamic system with forced water
169 circulation following the same methodology as shown for *C. bifermentans*.

170 The coupons were withdrawn after seven days in which the total biofilms were fully
171 built. The coupons were fixed to a nylon wire and submitted to different essential oil
172 concentrations using *Erlemeyer* flasks capped with cotton. The flasks were incubated on a
173 reciprocating shaker at 25 °C and 50 rpm during 0, 60, 90 and 120 minutes. In this case, an
174 essential oil concentration of the 20.0 µg.L⁻¹ was added to 250 mL of salt solution (0.85 g/L)
175 together 200.0 µL of Tween (80% v/v). Sterile water was used as negative control and 200.0
176 µL of Tween (80% v/v) as positive one. After the contact time with the *L. gracilis* Schauer
177 essential oil every coupon was scraped separately for quantifying the microbial density, in
178 terms of colony forming unity (CFU) using a medium specific to fungi. The colony forming
179 unit (CFU) was obtained from dilution of 10 mL of total biofilms, thus from every dilution
180 samples of 0.1 mL were added directly to the *Saborround* medium and spread with the aid of
181 a Drigalski holder. The plates were stored in BOD at 30 °C for 48 hours. Experiments were
182 carried out in triplicate.

183

184 3. Corrosion experiments

185 3.1. Electrochemical assays

186 The corrosion experiments were carried out using an electrochemical cell containing
187 NaCl (0.5M) as the corrosive medium and three electrodes. The copper electrode was used as
188 the working electrode, it is highlight that the Ag/AgCl electrode was used as the reference
189 electrode, and the platinum electrode was used as counter-electrode. The inhibition corrosion
190 efficiency on AISI 1020 carbon steel due to the *L. gracilis* Schauer essential oil
191 microemulsion was assayed by the linear potentiodynamic polarization (LPP) and
192 electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques by means of the
193 potentiostat/galvanostat Autolab® model PG STATE 204 (Metrohm) coupled to NOVA
194 software version 1.11. The essential oil concentration assayed were 0.0, 20.0, 40.0 and 60.0
195 µg.L⁻¹.

196 The polarization curves were obtained by scanning the potential below and above 300
197 mV in relation to the open circuit potential using a rate of 1.0 mV/s by 180 minutes of
198 immersion. The assays for EIS were carried out using the open circuit potential at 25 °C at a
199 frequency ranging from 10000 Hz to 6 MHz. The TAFEL straight extrapolation method was
200 used to obtain the curves and the corrosion inhibition efficiency (IE) according to Eq. (1):

201

$$202 \text{IE}(\%) = \frac{I_{corr} - I_{corr}(inh)}{I_{corr}} \quad \text{Eq. (1)}$$

203 where I_{corr} and $I_{corr(inh)}$ are the AISI 1020 carbon steel currents in the absence and presence of
204 each essential oil concentration, respectively.

205

206 3.2. Gravimetric analysis

207 Biocoupons (AISI 1020 carbon steel) were used to investigate the mass loss after
208 contact with each essential oil concentration by gravimetry for the contact time previously
209 described. The specimens were withdrawn from the dynamic system every four days thus
210 after pickling of microbial biofilms they were washed using acetone and water followed by
211 drying with hot air. The mass loss was calculated according to Eq. (2):

212

$$213 \quad CR = 87.6 \frac{W}{dAt} \quad \text{Eq. (2)}$$

214

215 where CR is the corrosion rate, W is the mass loss (mg), d is the biocoupon density (g/cm^3), A
216 is the biocoupon exposed area (cm^2) and t is the exposure time (h).

217 The AISI 1020 carbon steel density was 7.86 g/cm^3 according to NACE-TM (2000).
218 The corrosion rates were calculated in mm/year. The test was performed in triplicate for each
219 experiment at room temperature, and the observed differences were found to be lower than
220 5%. An analysis of variance was carried out using the different microemulsion contact time.
221 The positive control used only the biocoupon and distilled water, while a 0.5 M NaCl solution
222 was used as the negative control.

223

224 4. Statistical analysis

225 Tukey test at 5% confidence level was used to determine the inhibition rate of the
226 essential oil over *C. bif fermentans*. For inhibition in the biofilms it was used a fully casualised
227 delineation in which it was assayed the contact time of the biofilms to *L. gracilis* Schauer
228 essential oil with three repetitions for each treatment. For analysis the data were transformed
229 to $\log(x+1)$ and submitted to analysis of variance and mean separate by Tukey test.
230 Regression curves were obtained from the raw data mean, in this case the contact time was the
231 independent variable. Exponential, logarithm, quadratic and polynomial model were selected
232 based in the coefficient of determination (R^2) as well as the mean squared residue (MQR).
233 The statistical analysis was performed using the software for variance analysis system
234 (SISVAR 5.6).

235

236 4. Results and discussion

237 4.1. *L. gracilis* Schauer essential oil chemical characterization and yield

238 The essential oil of *L. gracilis* Schauer resulting from the extraction process showed a
239 higher concentration of the bioactive substance carvacrol (approximately 50%). However, it
240 was observed a quite lower thymol quantity as shown in Table 1.

241 It is important to highlight that oil extraction yield was of 1.74%. The quantitative
242 fluctuations of the majority essential oil components occurred mainly due to genetic as well as
243 environmental conditions of the plant cultivation. It is known that others factors such as the
244 harvest time, season of year, climate, soil as well as sample quantity and life cycle in which
245 the plant is submitted besides the harvesting local can affect directly the chemical
246 composition and the raw yield of the oil (Bakkalli et al., 2008; Moraes et al., 2011). This
247 ranging on the chemical composition can also happen in the same locality despite having
248 relatively similar environmental conditions (Dewick, 2011). Another important factor that
249 plays an important role in the bioactive compounds produced by the plants is the parasite
250 attack, since the production of these substances works as a defense mechanism to the plant,
251 then helping in the inhibition attack as well as in the infection process by pathogens (Dewick,
252 2011).

253

254 4.2. Biomolecular identification of the bacteria

255 A molecular identification of bacteria obtained from biofilm was carried out after 48 h
256 of cultivation growth. In this case, gene sequencing of 16S rRNA subunit was assayed and
257 further compared to the DNA and proteins sequencing data bank, *Genbank*. The PCR product
258 fragments of 1320 bp (Fig. 1) showed 99.9% similarity to the bacteria *Clostridium*
259 *bifermentans*, according to *Genbank*. It is important to highlight that this bacteria is common
260 in oil industry. There are in the literature some studies that used a quite similar methodology
261 and that identified the genus *Clostridium* associated to microbial corrosion in pipeline on
262 fields of oil and gas. Jan-Roblero *et al.* (2008) used molecular assay to phylogenetic
263 identification of bacterium in the pipeline of gas during oil production in Mexico and detected
264 the presence of *Clostridium* causing corrosion in association with other bacterium on a
265 biofilm. They reported that the presence of genus *Clostridium* is favored by the ideal
266 conditions generated by the *Enterobacteria* also is quite common *Clostridium* being
267 associated with sulfate-reducing bacteria (SRB) in biofilm. Khelifi *et al.* (2009) showed this
268 bacterium is predominant, including *C. bifermentans*, in water of industrial treatment also

269 associated to SRB. Recently, Biswas *et al.* (2013) reported this genus presence in fungal
270 biofilms built in treated water pipeline. It is highlighted that this bacterium favors
271 biocorrosion mainly for producing sulfide and hydrogen sulphide through the cystein and
272 sulphate-rich compounds fermentation, respectively (Marreto *et al.*, 2008; Leja *et al.*, 2013).
273 Specifically on carbon steel *C. bifermentans* causes *pitting* and associated others bacteria it
274 potentiates this action (Palaniappan & Toleti, 2016).

275

276 **4.3. Essential oil minimum inhibitory concentration (MIC) over *C. bifermentans***

277 An evaluation of the MIC for *L. gracilis* Schauer essential oil was carried out during
278 incubation in Petri plates at 30°C for 24 hours. It was observed that samples in which the
279 essential oil of *L. gracilis* Schauer was lower or equal to 10.0 µg.L⁻¹ they were inefficient
280 over the bacteria growth. However, concentrations of 30.0, 60.0 and 90.0 µg.L⁻¹ inhibited
281 completely the bacteria growth (Table 2). Albuquerque *et al.* (2006) assayed the influence of
282 essential oil of *L. gracilis* Schauer up to 400 µg.L⁻¹ over the *Bacillus pumilus* growth. This
283 bacterium is also associated to biofilms causing biocorrosion. However, they did not observe
284 any effect over the *B. pumilus* growth for this range of concentration. In order to define the
285 MIC the concentration range it was reduced from 15.0 to 30.0 µg.L⁻¹ (15.0, 20.0, 25.0 and
286 30.0 µg.L⁻¹). It was observed that 20 and 25 µg.L⁻¹ allowed the inhibition of the bacteria
287 growth *in vitro* then the former was taken as the MIC (Table 3). Albuquerque *et al.* (2006)
288 investigated the effect of the essential oil of *L. gracilis* Schauer over several microorganisms
289 and reported a MIC of the 420 µg.L⁻¹. It is known that each oil concentration acts in a
290 different way over the microorganisms then showing or not inhibition concerning the cell
291 growth. Also, characteristics such as type of microorganism as well as oil chemical
292 composition play an important role on the MIC. As shown by the results of oil chemical
293 characterization, despite the lower thymol concentration there was a complete inhibition of *C.*
294 *bifermentans*. Additionally, it is possible the synergism occurrence between these two
295 molecules, thymol and carvacrol, then favoring the antimicrobial activity of the oil. Others
296 substances such as *p*-cymene and γ -terpinene coupled to carvacrol could strengthen the
297 antimicrobial activity of the essential oils (Palaniappan & Toleti, 2016). Therefore, is possible
298 that in this study the presence of these others compounds strengthened the antimicrobial
299 activity of the essential oil of *L. gracilis* Schauer over *C. bifermentans*, then inhibiting totally
300 the *in vitro* cell growth.

301

302 4.4. Antifungal activity of essential oil of *L. gracilis* Schauer

303 The essential oil of *L. gracilis* Schauer showed *in vitro* different behaviors ($p < 0.05$)
304 concerned to the contact time of the fungal biofilms. The results showed that there was
305 significant difference of the essential oil of *L. gracilis* Schauer over the biofilms ($p < 0.05$) for
306 the four contact times (0, 60, 90 and 120 minutes) assayed. In this case, a variation coefficient
307 (VC) of 26.65 was observed. Also, the decrease of the CFU concerned to the contact time of
308 essential oil of *L. gracilis* Schauer fitted to a polynomial model in which a time of 120
309 minutes was determined as the needed time to inhibit completely the fungal growth as shown
310 in Fig. 2.

311 Currently, it has been observed the occurrence of new strategies for MIC control since
312 this is a problem that affects different industrial sectors and increases year to year. Also, the
313 use of biocides leads to a higher toxicity potential that brings to a non favorable option
314 sometimes. The natural products use to carry out the task is playing role mainly for
315 environmental as well as economical reasons despite is not a new practice. Some studies have
316 shown the efficiency of these natural products in the biofilms control, mainly the bacterial one
317 (Silva et al., 2010; Marques et al., 2012; Fadel et al., 2013). Pioneer studies using plant
318 extracts were carried out primarily to act of the fungal biofilms, for instance, the use of aqueous
319 extract of *Allium sativum* and *A. cepa* inhibited by full the growth on different fungal types
320 (Ferreira et al., 2011; Marques et al., 2012). Others natural products such those from algae
321 and cyanobacteria were assayed in order to control the biofouling and biocorrosion showing
322 good results over the fungal growth inhibition (Acevedo et al., 2013; Moura et al., 2013).

323 The antimicrobial activity of the essential oil of *L. gracilis* Schauer shown in this
324 study is probably due to the presence of carvacrol it has been cited in the literature that it can
325 act over pathogenic as well as non pathogenic fungals. The main mechanism of this substance
326 action as well as of thymol over fungal is based on the mitochondrial membrane
327 depolarization caused by the reduction of the cellular membrane potential then affecting the
328 pH, the ATP synthase, the calcium cycle and other canals. Therefore, the occurrence of a
329 conidial germination reduction leads to the fungi death (Bakkalli et al., 2008).

330 In the present study, the essential oil of *L. gracilis* Schauer appeared as a powerful
331 antifungal biocide even at lower concentration, then confirming its fungicide power. The use
332 of this substance can represent as an alternative to control efficiently the biocorrosion on oil
333 and others industries. It has some advantages since is environmentally-friendly, obtained from a
334 renewable source and shows lower toxicity.

335 4.5. Corrosion experiments

336 4.5.1. Electrochemical assays

337 The essential oil of the *L. gracilis* Schauer did not show activity compared to the
338 control when the EIS analysis was performed on the AISI 1020 carbon steel at room
339 temperature. According to the Nyquist model none assay was able to form prominent
340 capacitive arcs, reducing the current intensity. All gave lower activities than the control (NaCl
341 0.5M) as seen in Figure 3. The concentrations of the 20.0 and 40.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ showed better
342 performance than the higher concentration assayed (60.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) but not enough to reduce the
343 current over the carbon steel. This result is not common but factor as temperature, pH and
344 type of medium used can influence the efficiency of natural product on corrosion mainly due
345 to the interaction of the components of the natural product (Zaferani et al., 2013; Usher et al.,
346 2014).

347 On the other hand, LPP analysis as shown by Tafel curves for essential oil of *L.*
348 *gracilis* Schauer at different concentrations, compared to the control, showed at 60.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$
349 the essential oil was able to reduce the current ($I_{\text{corr}} = 2.59$) increasing the potential and thus
350 reducing the mass loss of the AISI 1020 carbon steel (Data not shown). As shown in Fig. 4,
351 the anodic and cathodic polarization curves showed reduction of the current intensity in both
352 branches, with the cathodic showing higher inhibition due to the use of 60.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of
353 essential oil.

354 Gravimetric assays by mass loss performed out of the electrochemical cell and using a
355 higher range of contact time for the essential oil of the *L. gracilis* Schauer showed that this oil
356 was able to reduce the corrosion rate compared to the control (NaCl 0.5M). In this case, the
357 corrosion rate was kept near zero during all the time of contact (Fig. 5). Therefore, the
358 gravimetry assays confirm the results of LPP analysis, showing that essential oil of the *L.*
359 *gracilis* Schauer can act as a corrosion inhibitor even in a medium with corrosive
360 characteristics (Gentil, 2011) acting even at lower concentration.

361

362 5. Conclusion

363 In this study it was investigated the anti-microbial potential of the essential oil of the
364 *L. gracilis* Schauer on microbial biofilms. This oil was able to inhibit the *C. bif fermentans*,
365 showing a MIC of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Antifungal activity was also observed in biofilms in which 120
366 minutes was found to completely reduce the CUF to zero. The biocide activity of this
367 essential oil is mainly due to presence of carvacrol acting in synergism with others molecules

368 such as *p*-cymene e γ -terpinene. An oil concentration of the 60.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ was able to reduce
369 the mass loss of 1020 AISI carbon steel as shown by LPP and gravimetry analysis. The use of
370 essential oil of *L. gracilis* Schauer can be alternative to the MIC control since is
371 environmentally-friendly, renewable and shows lower toxicity.

372 **Acknowledgements**

373 The authors would like to thank CAPES/Brazil, the National Institute of Technology -
374 NIT (Brazil) and CENPES/PETROBRAS for providing the financial support.

375

376 **Conflicts of Interest**

377 The authors declare that they have no conflicts of interest.

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387 **References**

[1] Acevedo, M.S., Puentes, C., Carreño, K., León, J.G., Stupak, M., García, M., Pérez, M.,
Blustein, G., 2013. Antifouling paints ba

- sed on marine natural products from Colombian Caribbean. J. Internat. Biodet. Biodeg. 83, 97-104. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.002.
- [2] Albuquerque, C.C., Camara, T.R., Mariano, R.L.R., Willadino, L., Junior, C.M., Ulisses, C., 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. Brazilian Archiv. of Biol. and Techn. 49, 527-535. doi:10.1590/S1516-89132006000500001.
- [3] Bakkalli, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chem. Toxicology 46, 446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [4] Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L., Lecadet, M-M., 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. malaysia, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. J. Bacter. 11, 3099-3105. doi: 10.1128/jb.178.11.3099-3105.
- [5] Biswas, K., Taylor, M.W., Turner, S.J., 2013. Successional development of biofilms in moving bed biofilm reactor (MBBR) systems treating municipal wastewater. Appl. Microb. Biotec. 13, 5082-5088. doi: 10.1007/s00253-013-5082-8.
- [6] Dewick, P.M., 2011. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons LTDA, University of Nottingham, UK.
- [7] Duque, Z., Ibars, J.R., Sarro, M.I., Moreno, D.A., 2011. Comparison of sulphite corrosivity of sulphate- and non-sulphate-reducing prokaryotes isolated of oilfield injection water. Material and Corrosion. 62, 6291-6298. doi:10.1002/maco.201106298.
- [8] Fadel, F., Ben Hmamou1, D., Salghi1, R., Chebli1, B., Benali, O., Zarrouk, A., Ebenso, E.E., Chakir5, A., Hammouti, B., 2013. Antifungal activity and anti-corrosion inhibition of *Origanum compactum* extracts. Internat. J. Electrochem. Sci. 8, 11019-11032. doi:80911019.
- [9] Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Santos, A.F.S., Sá, R.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., Morais, M.M.C., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L.V., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2011. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. Letters Appl. Microb. 53,186-192. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03089.x.
- [10] GenBank. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em Março de 2009.
- [11] Gentil, V., 2011. Corrosão, 6ª ed., LTC, Rio de Janeiro.
- [12] Gu, J., 2012. New understandings of biocorrosion mechanisms and their classifications. J. Microb. Biochem. Technol. 4, 3-4. doi:10.4172/1948-5948.1000e107.
- [13] Gu, J., 2014. Theoretical modeling of the possibility of acid producing bacteria causing fast pitting biocorrosion. J. Microb. Biochem. Technol. 6, 2. doi:10.4172/1948-5948.1000124.
- [14] Jan-Roblero, J., Romero, J., Amaya, J.M., Le Borgne, M., 2008. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. Appl. Microbial Biotechnology. 64, 862-867. doi:10.1007/s00253-004-1613-7.
- [15] Khelifi, E., Bouallagui, H., Fardeau, M.L., Touhami, Y., Godon, J.J., Cayol, J.L., Ollivier, B., Hamdi, M., 2009. Fermentative and sulphate-reducing bacteria associated with treatment of an industrial dye effluent in an up-flow anaerobic fixed bed bioreactor. Bioch. Engin. J. 45, 136-144. doi:10.1016/j.bej.2009.03.006.
- [16] Lanneluc, I., Langumier M., Sabot, R., Jeannin, M., Refait, P., Sablé, S., 2015. On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. J. Biodet. Biodeg. 99, 55-65.

doi:10.1016/j.ibiod.2015.01.003.

- [17] Larsen, L.M., Nielsen, T.H., Ploger, A., Sorensen, H., 1988. Rapid and efficient method for the isolation and characterization of plant aromatic choline enterases. *J. Chromat.* 450, 121-131. doi:10.1016/S0021-9673(00)90723-4.
- [18] Leja, K., Czaczyk, K., Myszk, K., 2013. The ability of *Clostridium bifermentans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. *Springer Plus* 2, 44. doi:10.1186/2193-1801-2-44.
- [19] Lieser, M.J., Stek, C., 2010. Composite and the Future of Society: preventing a legacy of costly corrosion with modern materials. *Owens Corning*, 1-17.
- [20] Little, B.J., Lee, J.S., 2007. *Microbiologically Influenced Corrosion*. Inc. John Wiley & Sons. 10: 22p.
- [21] Magot, M., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77, 103-116. doi:10.1023/A:1002434330514.
- [22] Marques, J.M., Almeida, F.P., Lins, U., Seldin, L., Korenblum, E., 2012. Nitrate treatment effects on bacterial community biofilm formed on carbon steel in produced water stirred tank bioreactor. *World J. Microb. Biotechn.* 28, 2355-2363. doi:10.1007/s11274-012-1043-0.
- [23] Marreto, R.N., Almeida, E.E.C.V., Alves, P.B., Niculau, E.S., Nunes, R.S., Matos, C.R.S., Araujo, A. A. S., 2008. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermoc. Acta* 475, 53-58. doi:10.1016/j.tca.2008.06.015.
- [24] Mattos, F.J.A., Machado, M.I.L., Craveiro, A.A., Alencar, J.W., Silva, M.G.V., 1999. Medicinal plants Northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* H. B. K (Verbenaceae). *J. Essent. Oils Resear.* 11, 666-668. doi:10.1080/10412905.1999.9711990.
- [25] Moraes, V.R.S., Nogueira, P.C.L., Gomes, S.V.F., 2011. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química*. 36, 64-77. doi:10.1590/S0100-46702011000100005.
- [26] Moura, M.C., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 2013. Na outline to corrosive bacteria. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Ed. A. Méndez-Vilas, FORMATEX.
- [27] NACE, 2000. Laboratory Corrosion Testing of Metals in Static Chemical Cleaning Solution at Tempera, Document number TM-0193.
- [28] Oliveira, O.R., Terao, D., Carvalho, A.C.P.P, Innecco, R., Albuquerque, C.C., 2008. Efeito do óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. *Revista Ciência Agronômica* 39, 94-100. doi:953/195317606014.
- [29] Palaniappan, B., Toleti, S.R., 2016. Characterization of microfouling and corrosive bacterial community of a firewater distribution system. *J. Biosc. Bioeng.* 4, 435-441. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.08.009.
- [30] Pimenta, M., Fernandes, L.S., Pereira, U.J., Garcia, L.S., Leal, S.R., Leitão, S.G., Salimena, F.R.G., Viccini, L.F., Peixoto, P.H., 2007. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). *Rev. Brasileira de Botânica* 30, 211-220. doi:10.1590/S0100-84042007000200006.

- [31] Silva, J.P.L., Duarte-Almeida, J.M., Perez, D.V., Franco, B.D.G.M., 2010. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 136-141. doi:10.1590/S0101-20612010000500021.
- [32] Usher, K.M., Kaksonen, A.H., Cole, I., Marney, D., 2014. Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *J. Internat. Biodet. Biodeg.* 93, 84-106. doi:10.1016/j.ibiod.2014.05.007.
- [33] Van D. L. H.; Kratz, P. H., 1963. *J. Chromat. A* 11, 463. doi:10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- [34] Videla, H.A., Herrera, L.K., 2009. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. *Internat. Biodet. & Biodegrad.* 63, 896-900. doi:10.1016/j.ibiod.2009.02.002.
- [35] Zaferani, S.H., Sharifi, M., Zaarei, D., Shishesaz, M.R., 2013. Application of eco-friendly products as corrosion inhibitors for metals in acid pickling processes – a review. *J. Environ. Chem. Engin.* 1, 652-657. doi:10.1016/j.jece.2013.09.019.

Table 1 - Essential oil of *Lippia gracilis* Schauer chemical characterization.

Compound	*R.I	Total (%)
Hexenol<(4Z)->	871	1.46
Thujene< α ->	924	1.80
Pinene< α ->	932	0.44
Pinene< β ->	974	0.40
Myrcene	988	4.29
Terpinene< α ->	1014	1.68
Cymene<O->	1022	4.50
Sylvestrene	1025	0.46
Ocymene<(E)- β ->	1044	0.33
Terpinene< γ ->	1054	14.97
Sabinene Hidrate <cis->	1065	0.45
Terpineolene	1086	1.14
Epoxymyrcene<6,7->	1090	0.14
Linalool	1095	0.70
Menthatriene	1108	0.03
Terpinen-4-ol	1174	4.67
Thymol methylether	1232	0.59
Carvacrol methylether	1241	0.56
Carvacrol	1298	49.51
Thymol acetate	1349	0.01
Carvacrol acetate	1370	0.14
<u>Total Chemical Classes</u>		
Benzenoids	-	55.90
Monoterpenoids	-	33.80
Sesquiterpenoids	-	10.20
Total		99.90

***R.I.**: Retention index

Table 2 - MIC of essential oil of *L. gracilis* Schauer for the higher range concentration experiment. Tukey test ($p < 0.05$).

Essential oil concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Inhibition zone of <i>C. bifermentans</i> (mm)	Inhibition (%)
0.0	0	0
0.5	0	0
1.0	0	0
5.0	0	0
10.0	0	0
30.0	89 ± 0.9^a	100.0
60.0	89 ± 0.9^a	100.0
90.0	89 ± 0.9^a	100.0

Table 3 - MIC for essential oil of *L. gracilis* Schauer using the lower range concentration, a MIC of $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was considered. Tukey test ($p < 0.05$).

Essential oil concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Inhibition zone of <i>C. bifermentans</i> (mm)	Inhibition (%)
0.0	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0
20.0	89 ± 0.9^a	100.0
25.0	89 ± 0.9^a	100.0

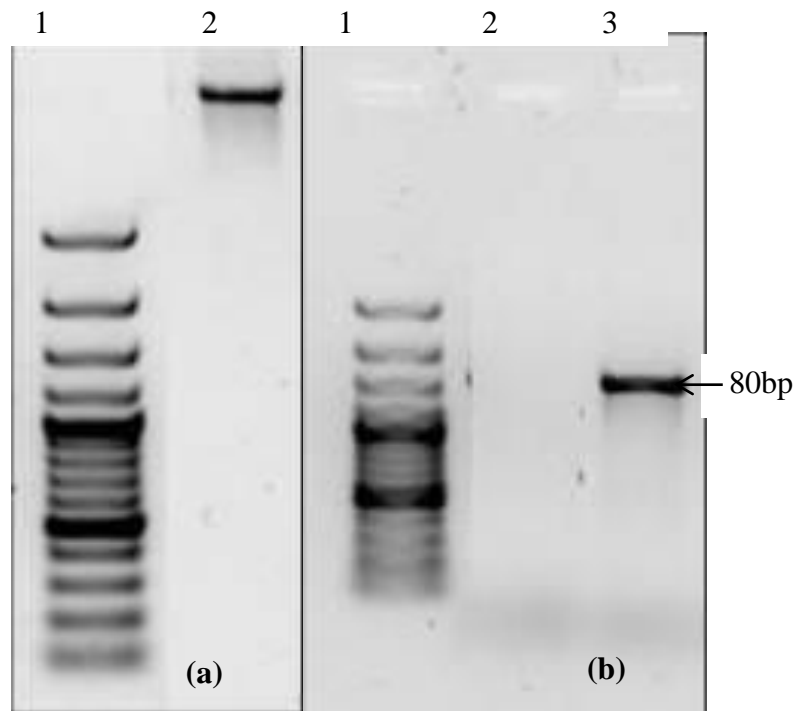


Figure 1: Electrophoresis of the products obtained using the SYBR stain in 1% agarose gel. **(a) bacterial DNA genomic:** lane 1, mark of 80 bp and 2 DNA extracted from the bacteria. **(b) Amplification by primers standard SAdir and S17rev from subunit 16S gene by PCR-GeneAmp:** lane 1, molecular mark; lane 2 blank and 3 bacteria sample with 99.9% similarity to *Clostridium bifermentans* according to *GenBank*.

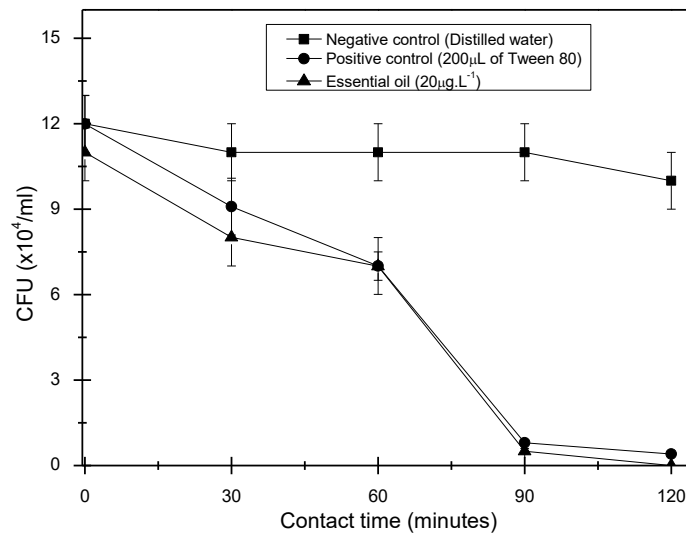


Figure 2 - Effect of the *L. gracilis* Schauer essential oil contact time over the fungal biofilm using an oil concentration of 20.0 µg.L⁻¹. Negative control: distilled water. Positive control: 200µL of Tween (80%). The means were obtained in triplicate.

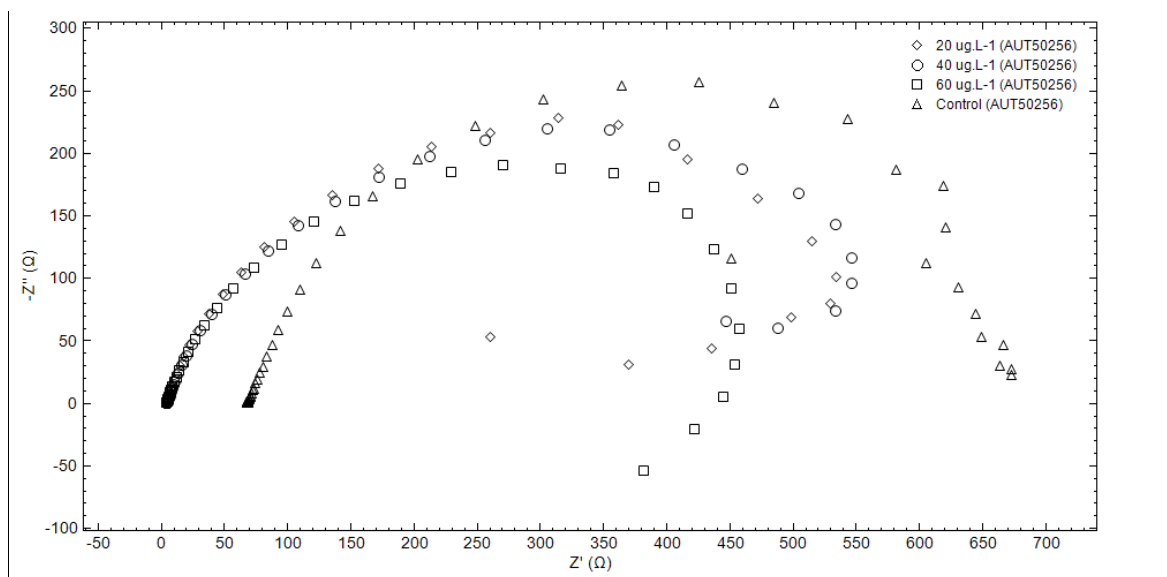


Figure 3 – EIS diagram for AISI 1020 carbon steel in salting medium (NaCl 0.5M) in the presene of different concentrations of the *L. gracilis* Schauer essential oil.

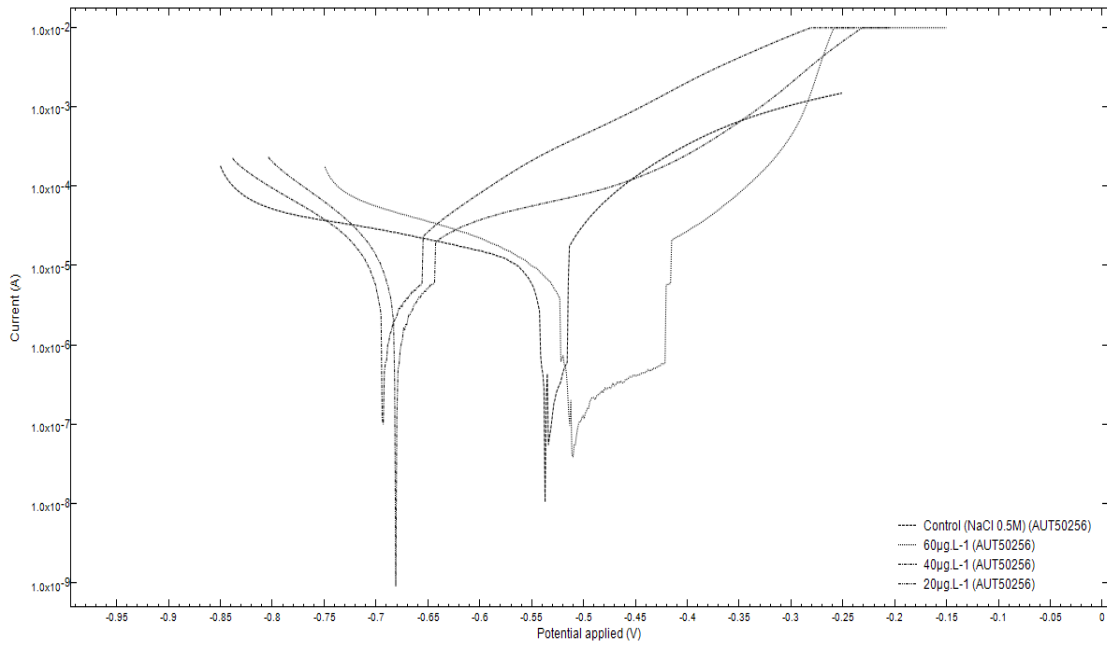


Figure 4 – Polarization curves for AISI 1020 carbon steel in the salting medium (NaCl 0.5M) in the presence of different concentrations of *L. gracilis* Schauer essential oil using as control NaCl (0.5M).

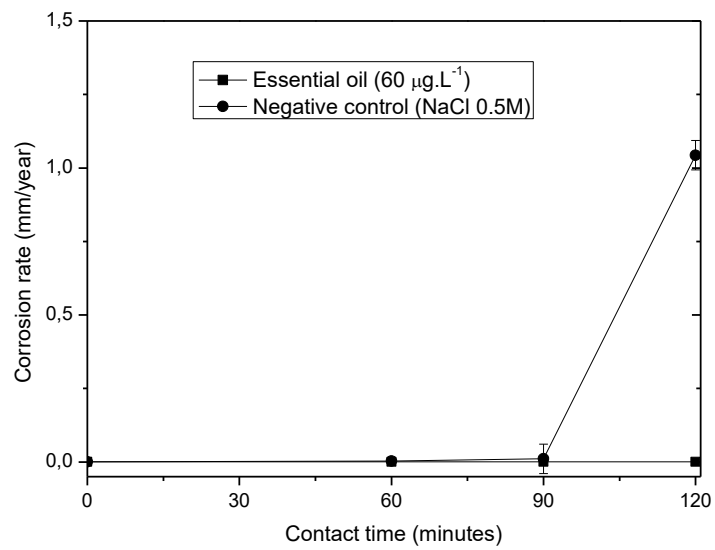


Figure 5 - Corrosion rate of essential oil of *L. gracilis* Schauer (60µg.L⁻¹) in different contact time (in minutes).

Antibiofilm activity and biocorrosion control by means of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) microemulsion system

Marcelino Gevilbergue Viana¹, Márcia Tereza Soares Lutterbach³, Cynthia Cavalcanti de Albuquerque⁴, Djalma Ribeiro da Silva², Jaécio Carlos Diniz⁵, Ewerton Richard Fernandes Teixeira², Francisco Josiel do Nascimento Santos⁶, Everaldo Silvino dos Santos^{1*}

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal – RN, Brasil

²Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal – RN, Brasil

³Instituto Nacional de Tecnologia – INT, Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação – LABIO, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

⁴Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas – DCB, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, Mossoró – RN, Brasil

⁵Laboratório de Química, Departamento de Química – DQ, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, Mossoró – RN, Brasil.

⁶Laboratório de Corrosão, Departamento de Engenharia Química – DEQ, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Mossoró – RN, Brasil.

E-mail: everaldo@eq.ufrn.br

Running Title: biofilm and biocorrosion control by oil from *Lippia gracilis* Schauer

Abstract

We investigate the use of the essential oil from a *Lippia gracilis* Schauer microemulsion system as a biocide and antibiofouling agent upon biofilms as well as the effect of this microemulsion on the corrosion rate of AISI 1020 carbon steel. The results showed that a microemulsion type Winsor-IV was efficient in preventing the biofouling formation after 96 hours of contact and inhibited the growth of the sulfate reducing, iron-oxidizing bacteria as well as the fungi occurring at the biofilms after the 16 days of contact time. The antimicrobial action was likely due to a formation of a protective film.

Keywords: microbiologically influenced corrosion, microemulsion, antibiofouling, *Lippia gracilis* Schauer essential oil, biofilms.

1. Introduction

Production oil/water mixtures are characterized by a high level of contaminants as well as the presence of organic and inorganic particles coupled to different types of microorganisms that can build communities known as biofilms. The initial step in the formation of these communities is the accumulation of such particles and cells that follow a sigmoidal standard in space and time. At this point, a synergic mechanism occurs in different types of surfaces leading to corrosion mainly in the form of *pitting*. (Videla, 2003, Lenhart *et al.*, 2014).

Microbiologically influenced corrosion (MIC) plays a key role in many industrial processes (Prasad, 2000), and billion dollars are spent in the United States on maintenance and control of MIC (Gu, 2012). Furthermore, estimates suggest that in tropical countries more than US\$ 10 billion a year is spent, mostly by the oil and gas industry, because of direct/operational damage. Additionally, climate conditions such as high temperatures, high water salinity and other ecological characteristics can contribute to an increase in corrosion in these countries.

Different types of microorganisms such as bacteria and fungi present in biofilms can favor the MIC due to their metabolism activity or by the production of secondary metabolites. The biofilm development gives biological as well as ecological advantages for the species occurring in the communities where they can colonize different habitats and niches. Additionally, resistance to the external factors such as biocides is increased (Sutherland, 2001; Gambino & Cappitelli, 2016); therefore, the production of extracellular polymeric substances (EPS) is one of the main strategies used to increase this resistance (Beech *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2012; Boyle *et al.*, 2013; Baeza *et al.*, 2013; Jin & Guan, 2014).

In oil and gas companies, the use of biocides to control MIC is quite common. Biocides been used in different sectors to reduce the occurrence of microorganisms without inhibiting the corrosive process itself (Videla & Herrera, 2009). Many types of biocides are currently available in the market including those based on organochlorides or gases such as nitrogen. Despite this strategy for MIC control, others methods have been investigated for mitigating environmental issues caused by the biocides as well as for cost reduction. Among these alternative strategies is the use of plant products such as extracts and essential oils which are being considered largely for their environmental-friendly nature (Nicolaou *et al.*, 2012). Additionally, they have lower production costs, proven efficacy and can be easily

34 scaled up. The action mechanisms of these natural products are not limited to the elimination
35 of microbial-biofilms but can also induce chemical inhibition such as anodic and capacitive
36 impedance effects as well as protect the material surface for film development (Abdel-Gaber
37 *et al.*, 2011; Loto *et al.*, 2011).

38 Essential oils are volatile compounds of different chemical composition usually rich in
39 antioxidants and with a characteristic smell. They are formed by the secondary metabolism of
40 aromatic plants and show different functions such as insecticide, herbicide and defense
41 against active parasites (Bakkali *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.* 2011). Additionally,
42 antimicrobial activity mainly due to the phenolic compounds such as flavonoids and
43 terpenoids is attributed to essential oils (Albuquerque *et al.*, 2006; Sarikurkcu *et al.*, 2010;
44 Viuda-Martos *et al.*, 2010; Sarrazin *et al.*, 2012; Ferraz *et al.*, 2013).

45 The genus *Lippia* has approximately 250 species known as essential oil producers,
46 which occur mainly in Central America, tropical Africa and South America. They are common
47 in Brazil, where this genus can be found in the semiarid Northeast region (Terblanché &
48 Kornelius, 1996; Lambert *et al.*, 2001; Kunle, 2003; Albuquerque *et al.*, 2006; Pimenta *et al.*,
49 2007). *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) is a bush popularly known as “alecrim-da-
50 chapada” it has small branches and leaves rich in glandular trichomes. This plant’s essential
51 oil has been applied in medicinal uses such as controlling skin diseases and ulcers, respiratory
52 diseases such as sinusitis and bronchitis, influenza as well as antimicrobial and antitumor
53 activities (Pascual *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2013).

54 To enable manipulation to increase the interaction of the oil with its target, the use of
55 microemulsion systems has been proposed. The microemulsions are isotropic and colorless
56 thermodynamic stable systems of two liquids (usually water and oil) stabilized by a film of
57 surfactants at the oil/water interface. They are characterized by spherical aggregates with
58 diameters lower than 1400 Å (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2004). Due to its small
59 diameter, the degree of interaction as well as the molecule thermodynamic stability is
60 increased. Thus, these systems have been used in industrial processes mainly those carried out
61 at high temperature, since it could be kept constant (Langevin, 1988).

62 Therefore based on the antimicrobial relevance shown by *L. gracilis* Schauer and the
63 knowledge that plant products can decrease or even stabilize the corrosion rate of different
64 materials, we investigated the effect of the essential oil of *L. gracilis* Schauer using a
65 microemulsion system on the microbial biofilms in a dynamic system, on its antibiofouling
66 activity and on AISI 1020 carbon steel’s corrosion rate using impedance resistance and

67 electrochemical polarization techniques, gravimetry and surface analysis.

68

69 **2. Material and Methods**

70 **2.1 Chemical**

71 Nonionic surfactant polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80), chemical
72 formula ($C_{64}H_{124}O_{26}$) and molar mass 1310 g/mol was acquired from Sigma-Aldrich
73 (MO/USA). Deionized water was used in the microemulsion systems and was prepared using
74 a Milli-Q system.

75

76 **2.2 Harvesting of *Lippia gracilis* Schauer, essential oil extraction and chemical** 77 **characterization**

78 Samples of *L. gracilis* Schauer were harvested during a period of drought in the city of
79 Mossoró (5° 11' 17" South and 37° 20' 39" North) in Rio Grande do Norte state, Brazil. The
80 plant taxonomic characterization was carried out to compare the samples to an example
81 deposited in exsiccate at Dárdano de Andrade herbarium in the Federal Rural Semiarid
82 University (UFERSA) located at the above cited city. The record number was 12514.

83 The essential oil extraction process was carried out via hydrodistillation using the
84 *Clevenger* system coupled to a glass balloon. After the extraction process, the yield was
85 calculated, and the oil was stored at 4°C for further studies. Samples of essential oil of *L.*
86 *gracilis* Schauer were used for chemical characterization in which the oil composition was
87 determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry Hewlett-Packard GC/MS
88 (GC: 5890 SERIES II/ CG-MS: MSD 5971). Identification was performed by searching using
89 the equipment library and comparing the retention time with those obtained by the co-
90 injection of the oil together with linear hydrocarbon (C11 - C24) calculated according Van
91 den Dool & Kratz (1963). For comparison, other libraries and the literature were also
92 searched.

93 A CG assay was carried out in a Hewlett-Packard 5890 SERIES II CG
94 chromatographer coupled to a flame ionization detector (FID) and a silica capillary column (J
95 & W Scientific DB-5). The column temperature was 35°C and hydrogen (H_2) was used as the
96 carrier at a flow-rate of 1.0 mL/min. GC/MS for the oil was carried out using a Hewlett-
97 Packard GC/MS (GC: 5890 SERIES II/ GC-MS: MSD 5971) under the conditions as above,
98 except for changing the carrier to helium (He). The injected oil volume was 1.0 mL of a 1/100
99 ethyl acetate diluted solution.

100 **2.2. Microemulsion system**

101 The microemulsion determination for the essential oil of *L. gracilis* Schauer and
102 Winsor regions was carried out according to the methodology proposed by Dantas *et al.*
103 (2002). In this case, Tween 80 (80% v/v) was used as a surfactant, and the oil phase (25 µg.L⁻¹
104 essential oil) was used as a co-surfactant, while the aqueous phase was (sterilized deionized
105 water) was at a ratio of C/T = 1.

106 The Winsor regions were obtained by the determination of active material (surfactant
107 + co-surfactant) at the aqueous phase (AP) and oil phase (OP) by mass titrations. The active
108 material was initially titrated by adding the aqueous solution until the maximum solubility
109 point was reached. This was followed by a change in the system appearance. Next, a point
110 was prepared with a known composition in the monophasic region in the pseudoternary system
111 (T point), considered the titrant of all other points in the binary system: aqueous phase plus oil
112 phase (AP+OP) and co-surfactant (C)/surfactant (T) plus oil phase. The limits for solubility
113 curves of Winsor regions in the microemulsion system were determined by a mass balance.

114

115 **2.3. Antimicrobial activity**

116

117 **2.3.1. Total plankton microorganisms**

118 The detection of total plankton microorganisms consisted in verifying the presence or
119 absence of five different types of microorganisms: aerobic, anaerobic, sulfate-reducing (SRB)
120 and iron-reducing (IRB) bacteria as well as fungi. In the case of bacteria, 1.0 mL of
121 production water from a ship tank was added separately to flasks containing 10 mL of
122 different culture media. A total of three repetitions were performed for each type of bacterium
123 studied. For fungi, the same water quantity was added to Petri dishes followed by an addition
124 of Sabouraud Agar medium which was performed for a total of three repetitions. The plates
125 were incubated in BOD for 24 h at 30° C.

126 The culture media were established according to the type of the specific
127 microorganism. For the SRB, the modified Postgate E medium was used (0.5 g KH₂PO₄, 1.0 g
128 NH₄Cl, 1.0 g Na₂SO₄, 0.67 g CaCl₂·2H₂O, 1.68 g MgCl₂·6H₂O, 0.5 g FeSO₄·7H₂O, 5.0 g
129 NaCl, 1.0 g ascorbic acid, 1.0 g yeast extract, 7.0 mL sodium lactate (50% m/v), 4.0 mL
130 resazurin solution (0.025% m/v) per liter of medium). For the anaerobic bacteria assay, the
131 fluid medium to tioglycolate was used (5.0 g yeast extract, 15.0 g tryptone, 55.0 g glucose,
132 0.5 g sodium tioglycolate, 2.5 g sodium chloride, 0.5 g L-cystine, 0.001 g resazurin, 0.75 g

133 agar). For aerobic bacteria, a nutrient broth medium was used (10.0 g Lab-Lenco Powder,
134 10.0 g peptone and 5.0 g NaCl). For the IRB the citrate ferric medium was used (0.5 g
135 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g NaNO_3 , 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.134 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g
136 ammonium ferric citrate, 15.0 g agar) and the Sabouraud agar medium was used for fungi.
137 Each medium was sterilized after preparation, and the pH was adjusted if necessary. The
138 culture media for anaerobic microorganisms were deaerated using nitrogen gas (N_2).
139 Inoculation was carried out in BOD at 30°C using different times. For aerobic bacteria and
140 fungi, the incubation was conducted for 48 h, while for IRB, it was conducted for 14 days and
141 28 days for both anaerobic and SRB.

142

143 **2.3.2. Activity of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion system over the** 144 **microbial biofilms**

145 The carbon steel 1020 AISI biocoupons (7.0 x 3.5 cm) were used for studying both
146 antibiofouling and antimicrobial activities. They underwent a previous treatment to remove
147 impurities that were identified and were then added to the dynamic system. Sonication
148 treatment was performed (UltraCleaner 1600A® - Skymen) using dichloroethylene for 15
149 minutes, followed by washing with ethanol and acetone. Next, deionized water was used to
150 rinse the coupons followed by drying. After drying, the coupons were sonicated again for 15
151 minutes, and the process was repeated.

152 The dynamic system was built to simulate the operational conditions of a field pipeline
153 with similar biofilm formation. The system was made from acrylic and had a device to fix the
154 biocoupons as well as to allow water circulation. The biocoupons were placed tangentially in
155 the water stream direction to simulate the pipeline wall. The water circulation was carried out
156 using a peristaltic pump at a flow-rate of 500 mL/h. Figure 1 illustrates the dynamic system
157 used in this study. The coupons were withdrawn from the system after seven days, fixed
158 separately to a nylon wire and submitted to treatments of different concentrations of *L.*
159 *gracilis* Schauer essential oil in Erlenmeyer flasks that were shaken for 50 rpm at 25° C. The
160 contact time of the biofilms with the essential oil microemulsion was up to 16 days. Dimethyl
161 sulfoxide (25.0 µL) was used as a negative control and 25 mg glutaraldehyde was used as
162 positive control.

163 For studying the biocide activity, the microemulsion was put in contact to the
164 biocoupons and each four days two biocoupons were withdrawn and scraped separately for
165 microbial density counting. The pour plate technique was used to quantify the cells, and the

166 results are shown as colony forming units (CFU) for the fungi and most probable number
167 (MPN) for bacteria. Additionally, fluorescence microscopy ($\lambda=510$ nm) was used to quantify
168 the biofilm cell density using the method proposed by Würth *et al.* (2013) with modification.
169 In this case, after removal of the biofilms that had been previously kept in contact with the
170 microemulsion, the cell density was assayed after cultivation in specific medium depending
171 on the microorganism (fungi or bacteria). A run blank (with no microemulsion addition) was
172 used as a control. The results are shown as relative fluorescence relative unit (RFU).

173 A completely randomized design was used to investigate the influence of the biofilms'
174 exposure time to the microemulsion of the *L. gracilis* Schauer essential oil using three
175 repetitions for each treatment. For analysis, the data were submitted to analysis of variance
176 (ANOVA) and mean separate evaluation by Tukey test ($p<0.05$). The statistical analysis was
177 performed using the software for variance analysis system (SISVAR 5.6, *University of Lavras*
178 (UFLA) – Minas Gerais/Brazil).

179

180 **2.3.3. Scanning electron microscopy (SEM)**

181 The SEM was carried considering each contact time for the microemulsion of the
182 essential oil to the biocoupons. The coupons were prepared using a 1.0% glutaraldehyde
183 solution (consisting of 280.0 μ L glutaraldehyde (25%) with 6.72 mL deionized water). The
184 solution was added to tubes of 15 mL in which the coupons were inserted and left for 4 h.
185 After this contact time, the coupons were withdrawn and put in contact with the following
186 concentrations of ethanol: 50, 60, 70, 80 and 90%. The coupons were left in contact for 20
187 minutes with each ethanol solution, sequentially. Finally, the coupons were left for 20 minutes
188 in ethanol and acetone followed by drying. The coupons were methylated, and the critical
189 point was estimated.

190

191 **2.3.4. Antibiofouling activity of *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion**

192 For this assay, cleaned and dried biocoupons previously in contact with the
193 microemulsion were then immersed in the Erlenmyer flask containing 250 mL sterile water
194 before insertion in the dynamic system to observe the efficiency of the microemulsion in
195 avoiding the microbial biofouling formation. The biocoupons were shaken (150 rpm) at a
196 growing contact time with the microemulsion (0, 48 and 96 hours). In this case, a triplicate
197 was used. After the microemulsion contact period, the biocoupons were kept in the dynamic
198 system with forced water circulation for four weeks. After this time, they were withdrawn,

199 and the surface micrographs and the AISI 1020 steel wear were investigated. The corrosion
200 rate by mass loss was assayed according to Equation (2).

201

202 **2.3. Corrosion experiments**

203

204 **2.3.1. Electrochemical analysis**

205 The corrosion experiments were carried out using a conventional electrochemical cell
206 containing NaCl (0.5M) as the corrosive medium and three electrodes. The copper electrode
207 was used as the working electrode, the Ag/AgCl electrode was used as the reference
208 electrode, and the platinum electrode was used as counter-electrode. The efficiency of
209 inhibition corrosion on AISI 1020 carbon steel due to the *L. gracilis* Schauer essential oil
210 microemulsion was assayed by the linear potentiodynamic polarization (LPP) and
211 electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques using the potentiostat/galvanostat
212 Autolab® model PG STATE 204 (Metrohm) coupled to NOVA software version 1.11. The
213 steel region exposed to the corrosive medium had a 2.5 cm radius. The polarization curves
214 were obtained by scanning the potential below and above 300 mV in relation to the open
215 circuit potential using a rate of 1.0 mV/s by 180 minutes of immersion. The assays for EIS
216 were carried out using the open circuit potential at 25 °C at a frequency ranging from 10000
217 Hz to 6 MHz. The TAFEL straight extrapolation method was used to obtain the curves and
218 the corrosion inhibition efficiency (IE) according to Equation (1):

219

$$220 \quad \text{IE}(\%) = \frac{I_{corr} - I_{corr(inh)}}{I_{corr}} \quad \text{Equation (1)}$$

221

222 where I_{corr} and $I_{corr(inh)}$ are the AISI 1020 carbon steel currents in the absence and presence of
223 microemulsion, respectively.

224

225 **2.3.2. Gravimetric assays**

226 The same biocoupons used for the biocide activity after contact with the
227 microemulsion were used to evaluate the mass loss by gravimetry for different contact periods
228 (0, 8, 16 days). The specimens were withdrawn from the dynamic system every four days thus
229 after pickling of microbial biofilms they were washed using acetone and water followed by
230 drying with hot air. The mass loss was calculated according to Equation 2:

231

$$232 \quad CR = 87.6 \frac{W}{dAt}$$

Equation 2

233

234 where CR is the corrosion rate, W is the mass loss (mg), d is the biocoupon density (g/cm³), A
235 is the biocoupon exposed area (cm²) and t is the exposure time (h).

236 The AISI 1020 carbon steel density was 7.86 g/cm³ according to NACE-TM (2000).

237 The corrosion rates were calculated in mm/year. The test was performed in triplicate for each

238 experiment at room temperature, and the observed differences were found to be lower than

239 5%. An analysis of variance was carried out using the different microemulsion contact time.

240 The positive control used only the biocoupon and distilled water, while a 0.5 M NaCl solution

241 was used as the negative control.

242

243 3. Results and discussion

244

245 3.1. Chemical characterization of *L. gracilis* Schauer essential oil

246 The chemical characterization of *L. gracilis* Schauer essential oil showed an

247 expressive concentration of carvacrol (approximately 50.0%) but with a lower quantity of

248 thymol (approximately 0.59 %), as seen in Table 1. The total oil yield was 1.74%. It should be

249 noted that these two molecules are known for their antimicrobial activities as commented by

250 Costa *et al.* (2001), Botelho *et al.* (2007), Silva *et al.* (2013) and Bitu *et al.*, (2014). Changes

251 in the chemical components and the essential oil yield can be influenced by many factors.

252 Specifically for the chemical composition of *L. gracilis* Schauer essential oil, the plant age,

253 environment, genetics, presence or absence of parasites, type of soil and season have been

254 reported to alter significantly the carvacrol and thymol composition (Zein *et al.* 2012),

255 directly influencing the microbial activity. There is evidence that synergism occurs between

256 these two molecules that increases the degree of activity in relation to the microorganisms.

257 However, the presence of the others oil components such as γ -cymene e γ -terpinene can also

258 influence the *L. gracilis* Schauer antimicrobial activity (Pascual *et al.*, 2001). A fluctuation

259 was observed in the essential oil chemical composition, that could be explained by the

260 influence of the drought season, in which the plants were harvested, as it is characteristic of

261 the region they were harvested. The hydric stress can affect the plant metabolism, changing

262 the pathway as well as altering the secondary metabolites. Furthermore, the hydric stress

263 confers heat resistance and decreases in the water loss (Stitt, 2013).

264

3.2. Tests for planktonic microorganisms detection

All target microorganisms were detected in the samples of water after different incubation times in the culture media. For aerobic bacteria and fungi the best result was obtained after 24 h of incubation. For SRB the best result was obtained after 14 days of incubation in which an iron precipitate could be observed. For anaerobic and SRB, the best results were obtained after 28 days of incubation. The presence of SRB was detected according to the methodology proposed by Lowe *et al.* (2004): in this case, the SRB was evidenced by the color change in the medium, as it changed from pink (control) to a darker hue due to the production of FeS. For the anaerobic bacteria, the detection we used was assumed that a medium cloudy appearance was evidence of the presence of these microorganisms. Table 2 shows an estimate of the number of bacteria for a sample of production water of ship's ballast.

3.3. Microemulsion system

A rheological study was carried out to classify the microemulsion system of essential oil of *L. gracilis* Schauer by performing a scanning in the shear rate from 0 to 1000 s⁻¹ at 30 °C. As seen in Figure 2, there was a change in the regime from laminar to turbulent after 200 s⁻¹. This can be observed by the change in the slope, in Figure 2. Therefore, the shear stress was defined between 0 and 200 s⁻¹. In this region, the graph of shear stress versus shear rate was again plotted as shown in Figure 3, indicating that the fluid behavior was Newtonian with R² equal to 0.9992 (Kumar & Mittal, 1999). The viscosity stability of the microemulsion system was also determined in relation to the shear stress for the same range between 0 and 200 s⁻¹. There was an initial viscosity reduction reaching the minimal value where it was kept constant, as shown in Figure 4. The drop in diameter was also calculated and reached 93.20 nm at the point: 0.4% T, OP = 0.08% and AP = 99.52%, as shown in Figure 5. The drop in diameter as well as the visual phase characteristic allowed us to classify the system as a Winsor IV type, which is considered a homogeneous or monophasic system (Winsor, 1948).

3.4. Biocide activity for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion system

The microemulsion of *L. gracilis* Schauer essential oil showed biocide activity. During *in vitro* trials different behaviors were observed (p<0.05) among the microorganisms in relation to the contact time with the microemulsion. According to analysis of variance to the quantification values of the five microorganisms in relation to the different contact times (0, 8

298 and 16 days) the coefficient of variation (CV) was 27.5. Additionally, there was a significant
299 difference among the contact times of microemulsion of *L. gracilis* Schauer essential oil, the
300 type of microorganisms and the interaction among these factors ($p < 0.05$).

301 The MPN of the aerobic and anaerobic bacteria was not influence by the contact time
302 with the microemulsion, i.e., there was no difference from the positive control, despite the
303 slight drop in the anaerobic cell number after 16 days (Figure 6). Despite the lack of statistical
304 difference between the aerobic and anaerobic bacteria, we cannot conclude that the oil did not
305 show antimicrobial activity. It is possible that bacteriostatic action occurred, as there was no
306 increase in the number of cells with an increase of the contact time compared to the control.
307 Similar results were reported by Videla & Herrera (2004) when testing the effect of *Allium*
308 *cepa* extract in different concentration using eight contact times (from 5 minutes to 24 hours)
309 over the aerobic bacteria in biofilms, ultimately observing no biocide action.

310 Different factors can have an influence on the antimicrobial action of these specific
311 bacteria types. The oil concentration in the microemulsion plays an important role in
312 inhibiting the microorganism growth once higher concentrations can induce higher activity
313 (Tortora *et al.*, 2012). Therefore, the use of concentrations higher than $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ in the
314 microemulsion system of the *L. gracilis* Schauer essential oil can increase the efficiency due
315 to the possibility of breaking the matrix of extracellular polymeric substances (EPS) as well as
316 the interaction of the microbial community (Macêdo, 2000). This would then lead to cellular
317 death and a decrease in the bacteria growth rate. Additionally, another important factor for the
318 biocide activity is the location of the different the types of microorganism inside the biofilm,
319 i.e., there is often a hierarchy in the community due to the *quorum sensing* as well as the cell
320 type, in which some metabolites from one species can be used by another (Flemming &
321 Wingender, 2010; Boyle *et al.*, 2013). For instance, the anaerobic bacteria is located at
322 regions inner inside biofilms after the consumption of oxygen by the aerobic bacteria, thus it
323 becomes more difficult and sometimes derails the activity of different biocides (Javaherdashti
324 *et al.*, 2006). This structural design occurring in the biofilms is a biological adaptation that
325 hampers or inhibits the access of biocides to certain types of microorganisms (Simões *et al.*,
326 2010). It is probable that the microemulsion of the *L. gracilis* Schauer essential oil was not
327 completely successful to achieve completely these bacteria or there might have occurred a
328 neutralization of its activity due to its combination with metabolites or another chemical
329 component present in the biofilm derived from its metabolic diversity (Liengen *et al.*, 2014).
330 In relation to the aerobic bacteria, a cellular detachment probably occurred and then loss to

331 the medium of active microbial cells due to its location at outer part and peripheral of the
332 biofilm. Additionally, the microemulsion initial contact as well as the disruption of the EPS
333 favored the sessile bacteria, which then derailed the cellular metabolism and remained present
334 in the samples during the quantification analysis.

335 On the other hand, in the case of fungi, there was a decrease in the CFU in relation to
336 the contact time of *L. gracilis* Schauer essential oil. In this case, 16 days was enough for total
337 inhibition compared to the control, as seen in Figure 7. It is possible that the *L. gracilis*
338 Schauer essential oil in the microemulsion system worked quite well as an effective biocide
339 for the fungi present in the biofilms, performing its biocide action as reported in the literature
340 (Pascual *et al.*, 2001; Albuquerque *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2013). The *L. gracilis* Schauer
341 essential antifungal action is mainly caused by the presence of carvacrol and thymol
342 substances that can act together or separately over the cellular wall as well as on the ATP
343 synthase, thus acting directly in the microbial metabolism. Other species of fungi, filamentous
344 or not, were inhibited by the *L. gracilis* Schauer essential oil action or by the other majority
345 components (Dormans & Deans, 2000; Albuquerque *et al.*, 2006). However, it should be
346 noted that especially for the fungi present in the biofilms associated with the MIC, the biocide
347 action of the *Lippia gracilis* Schauer essential oil microemulsion worked very well. Natural
348 products and essential oil of other species reported in the literature were also able to act on
349 fungi corrosion-associated, but they did use a higher concentration than used in present study
350 (Hellio *et al.*, 2000).

351 The rate of iron oxidizing bacteria (IOB) as well as SRB was also reduced
352 proportionally to the contact time due to the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion
353 action (Figure 8). The IOB proved be more sensitive to the essential oil microemulsion
354 showing full reduction of growth rate after 16 days of contact. The BRS rate was reduced by
355 approximately 0.5 MPN after the final contact time using the essential oil microemulsion
356 system. It is likely that higher concentrations of essential oil in the microemulsion system
357 could favor a reduction in the SRB rate. It is known that the SRB is more resistant to the
358 biocide action mainly due to the structure of its cellular wall that interferes more with the
359 biocides (Zhang *et al.*, 2015). Additionally, another important parameter that could be
360 influenced by the biocide action is the location of the SRB inside the biofilm as well as the
361 total anaerobic bacteria, i.e., the fact that they are located more inwards due to the higher CO₂
362 rate and the reduction in the O₂ concentration. Therefore, it is more difficult for some
363 substances to directly reach the bacteria population, therefore slightly reducing this population

364 or even being totally ineffective.

365 Others plant-derived substances were able to inhibit the growth of SRB *in vitro* but not
366 by using a microemulsion system. For instance, Oguzie *et al.* (2013) used the ethanol extract
367 of *Capsicum frutescens* showing that it was able to inhibit the growth of *Desulfotomaculum*
368 species by the diffusion method on discs and over the corrosion rate. They reported that
369 substances such as alkaloids, tannins and saponins existing in the *C. frutescens* extract acted
370 on the bacteria metabolism, ceasing the growth. Korenblum *et al.* (2013) reported the
371 efficiency of essential oil of *Cymbopogon citratus* as well as of its majority component citral
372 over the sessile SRB and planktonics. Additionally, the Neem extract (4.0%) was efficient in
373 reducing the sessile SRB growth rate as well as the sulfide and biofilm formation (Bhola *et*
374 *al.*, 2014). Despite the lower concentration *L. gracilis* Schauer essential oil used in the
375 emulsion, the efficient biocide action over the biocide can also be observed in Figures 9 and
376 10. The micrographs showed an evident elimination of the microbial biofilms on the AISI
377 1020 carbon steel surface compared to the control after 16 days of contact to the
378 microemulsion. The quantification using the spectroscopy methods also showed a reduction in
379 the biofilms formation. It is probable that the microemulsion of essential oil reduced the
380 microbial community acting over the EPS, mainly due to the interaction of the essential oil
381 biomolecules with carbohydrates or other substances existing at the EPS structures. It is
382 known that diterpenes can interact strongly with carbohydrates and proteins (Nelson & Cox,
383 2012) which could have caused the disruption considering the elevated quantity of these
384 molecules in the EPS (Sutherland, 2001; Videla, 2003).

385

386 **3.5. Antibiofouling activity of *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion**

387 The use of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion as an antibiofouling
388 agent on AISI 1020 carbon steel was proven to be effective at the prevention of biofilm
389 formation after 96 h of contact. However, the microemulsion did not avoid the loss of mass in
390 the material. The micrographs showed the occurrence of corrosion products such as crystals
391 without biofilm formation as compared to the control (Figure 11). The results obtained by the
392 gravimetry showed a significant difference among the experiments using the microemulsion
393 in relation to the control after 48 h of contact. However, after the final contact period, there
394 was no significant difference in the increase of the corrosion rate (Figure 11c).

395 The preventing activity of the microemulsion on the biofilm formation is probably due
396 to a formation of a protective film that is typical of the microemulsion (Paul & Moulik, 2001).

397 It is known that organic substances occurring in the natural products can deposit
398 homogeneously over the material surface (Dantas *et al.*, 2002). However, despite the
399 prevention of the biofilm formation, the corrosive process itself could not be avoided.
400 However, it was likely of inorganic origin and not caused by MIC. The presence of corrosion
401 products and the increase in the corrosion rate evidenced after only 48 hours suggests that
402 microemulsion can keep the corrosion stable after the initial protective film formation, as
403 reported in the literature. However, it is no longer effective any more probably because of its
404 disruption.

405

406 **3.6. *L. gracilis* Schauer essential oil anticorrosion activity in microemulsion system**

407 The microemulsion of *L. gracilis* Schauer essential oil showed anticorrosion activity
408 for the 1020 AIS carbon steel in a salting medium, compared to the control, as shown using
409 the electrochemical and gravimetry techniques. For LPP experiments, the microemulsion
410 action differed in relation to the control, as shown by the kinetic parameters obtained from the
411 Tafel curves with the current reduction (I_{corr}) and the increase in the electrochemical potential
412 (E_{corr}) (Table 3). The protective film formation due to the microemulsion compounds
413 adsorption can be seen by the increase in the anode and cathode Tafel's constants which were
414 more significant than the control. Thus, the microemulsion likely reduced the metallic
415 dissolution at the anode region and hydrogen evolution occurred in the cathode due to the
416 reduction of the contact area. The EIS curves showed that there was a reduction in the current
417 with an increase in the potential due to the action of the *L. gracilis* Schauer essential oil
418 microemulsion system as shown in Figure 12. However, only 30% corrosion efficiency was
419 achieved. The electrochemical impedance data showed that indeed there was a difference in
420 the diagram obtained for the microemulsion systems in relation to the control in salt. As
421 shown in Figure 13 there was no difference between the microemulsion and the control in the
422 Nyquist model, yet the charge transfer resistance (R_{ct}) increased for the former and there was
423 a slight decrease in the electrical double-layer capacitance (C_{dl}) showing the microemulsion at
424 evaluated concentration was weakly adsorbed onto the steel surface. The corrosion inhibition
425 efficiency (IE) was not quite high only 14.0% as calculated from R_{ct} (Table 3). On the other
426 hand, the gravimetry assays showed that *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion was
427 able to reduce the corrosion process. Both experiments carried out in the electrochemical cell
428 showed a reduction in the AISI 1020 carbon steel mass loss when in contact to the
429 microemulsion. The reduction of the corrosion rate over the AISI 1020 carbon steel was

430 statistically similar to that of sterilized water (negative control) for almost the contact time (p
431 < 0.05) tested, as shown in Figure 14.

432 The surface analysis of the biocoupons pretreated with the microemulsion showed that
433 even for a lower *L. gracilis* Schauer essential oil concentration, there was a reduction in the
434 mass loss, as can be seen in the micrographs in Figures 15 and 16. The corrosive action of the
435 biocoupons in contact with the oil production water is evident (Figure 15a). However, after 16
436 days in contact with the microemulsion, the steel wear is reduced, as shown in Figure 15b.

437 The use of plant-derived natural products to avoid or reduce the corrosion rate has
438 been currently used as an alternative to the chemical biocides mainly for showing efficacy
439 action as well as being biodegradable. Many studies on the literature prove this product
440 utilization (Abiola & James, 2010; Rocha & Gomes, 2010; Felipe *et al.*, 2012; Umoren *et al.*,
441 2012; Benahmed *et al.*, 2013; Djeddi *et al.*, 2015; Muthukrishnan *et al.*, 2015). Most
442 substances considered inhibitors of corrosion act similarly to synthetic substances, mainly
443 reducing the electric resistance or the anodic and cathodic reactions on the metal surfaces
444 (Raja & Sethuraman, 2008). Additionally, there are some mechanisms of natural products that
445 are completely dependent of the chemical composition as well as the way these compounds
446 are obtained. Vegetal extracts rich in saponins, alkaloids and tannins are reported to strongly
447 inhibit corrosion by adsorption at the metal surface. The essential oils act by forming a
448 protective film over the material, thus interfering in the process of electron loss for the
449 medium and consequently slowing or inhibiting the corrosion (Bouyanzer *et al.*, 2010). In our
450 study *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion likely decreased the corrosion on the
451 AISI 1020 carbon steel after the microbial community elimination thus reducing the acid
452 production as well as the by-products of microbial metabolism that increase corrosion, mainly
453 pitting. Additionally, the higher quantity of carvacrol, approximately 50%, might also have
454 influenced the corrosion process as can aid in the corrosion control (El ouariachi *et al.*, 2015).
455 To the best of our knowledge, the use of water circulation to control corrosion is investigated
456 for the first time in the present study. This system showed significant advantage since it
457 provides a higher interaction with the whole biofilm community even at lower oil
458 concentration. Additionally, it has good interaction with the aqueous phase that is used in the
459 most steps of oil processing, thus garnering further interest, considering the industrial scale of
460 this phase.

461

462 **4. Conclusion**

463 The *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion investigated showed good biocide
464 activity against aerobic and total anaerobic bacteria. Additionally, it showed biocide activity
465 *in vitro* at lower concentrations on SRB as well as fungi occurring in biofilms existing on
466 carbon steel. It significantly reduced the microbial growth in only two hours of contact time.
467 The antimicrobial action of the essential oil is probably due to presence of the carvacrol. The
468 corrosion rate of AISI 1020 carbon steel was also controlled by the *L. gracilis* Schauer
469 essential oil microemulsion after 16 days of contact time. In this case, the inhibitory action
470 was due to the formation of a protective film over the carbon steel surface.

471

472 **Acknowledgements**

473 The authors thank CAPES/Brazil, the National Institute of Technology - NIT (Brazil)
474 and CENPES/PETROBRAS for the financial support.

475 **Conflicts of Interest**

476 The authors declare no conflict of interest.

477

478

References

Abdel-Gaber M, Khamis E, Hefnawy A. 2011. Utilizing Arghel extract as corrosion inhibitor for reinforced steel in concrete. *Material and Corrosion*. 62:1159.

Abiola OK, James AO. 2010. The effects of *Aloe vera* extract on corrosion and kinetics of corrosion process of zinc in HCl solution. *Corrosion Science*. 52: 661.

Albuquerque CC, Camara TR, Mariano RLR, Willadino L, Júnior CM, Ulisses C. 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49:527–535.

Baeza S, Vejar N, Gulppi M, Azocar M, Melo F, Monsalve A, Pérez-Donoso J, Vásquez CC, Pavez J, Zagal JH, Zhou X, Thompson GE, Páez MA. 2013. New evidence on the role of catalase in *Escherichia coli*-mediated biocorrosion. *Corrosion Science*. 67:32–41.

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446–475.
- Beech IB, Sunner JA, Hiraoka K. 2005. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology*. 8:157–168.
- Benahmed M, Selatnia I, Achouri A, Laouer H, Gherraf N, Akkal S. 2013. Steel corrosion inhibition by *Bupleurum lancifolium* (Apiaceae) extract in acid solution. *Transactions of the Indian Institute of Metals*. 68:393–401.
- Bhola SM, Alabbas FM, Bhola R, Spear JR, Mishra B, Olson DL, Kakpovbia AE. 2014. Neem extract as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: a preliminary investigation. *Engineering Failure Analysis*. 36:92–103.
- Bitu VCN, Fecundo HDTF, Costa JGM, Coutinho HDM, Rodrigues FFG, Santana NM, Botelho MA, Menezes IRA. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Shauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. *Natural Product Research*. 28:399–402.
- Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GA. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. 40:349–356.
- Bouyanzer A, Hammouti B, Majidi L, Haloui B. 2010. Testing Natural Fenugreek as an Ecofriendly Inhibitor for Steel Corrosion in 1 M HCl. *Portugaliae Electrochimica Acta* 28: 165.
- Boyle KE, Heilmann S, Ditmarsch D, Xavier JB. 2013. Exploiting social evolution in biofilms. *Current opinion in Microbiology*. 16:1–6.
- Costa SMO, Lemos TLG, Rodrigues FFG, Pessoa ODL, Pessoa C, Montenegro RC, Braz-Filho R. 2001. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *Journal Natural Products*. 64:792–795.
- Dantas TNC, Ferreira EM, Scatena H, Dantas AAN. 2002. Microemulsion system as a steel corrosion inhibitor. *Corrosion*. 58:723–727.
- Djeddi N, Benahmed M, Akkal S, Laouer H, Makhloufi E, Gherraf N. 2015. Study on methylene dichloride and butanolic extracts of *Reutera lutea* (Desf.) Maire (Apiaceae) as effective corrosion inhibitions for carbon steel in HCl solution. *Research on Chemical Intermediates*. 41:4595–4616.
- Dormans HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal Applied Microbiology*. 88:308–316.
- El ouariachi E, Bouyanzer A, Salghi R, Hammouti B, Desjobert J-M, Costa J, Paolini J, Majidi L. 2015. Inhibition of corrosion of mild steel in 1 M HCl by the essential oil or

solvent extracts of *Ptychotis verticillata*. Research on Chemical Intermediates. 41:935–946.

Felipe MBMC, Silva DR, Martinez-Huitl CA, Medeiros SRB, Maciel MAM. 2012. Effectiveness of *Croton cajucara* Benth on corrosion inhibition of carbon steel in saline médium. Materials and Corrosion. 63.

Ferraz RPC, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MBP, Silva TB, Machado WJ, Prata APN, Costa EV, Moraes VRS, Nogueira PCL, Bezerra DP. 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). Phytomedicine. 20:615 – 621.

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 8:623–633.

Gambino M, Cappitelli F. 2016. Biofilm responses to oxidative stress. Biofouling. 2:167–178.

Gu T. 2012. New understandings of biocorrosion mechanisms and their classifications. Microbial & Biochemical Technology. 4:4.

Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal BN. 2000. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. Applied Microbiology and Biotechnology. 54:543–549.

Hong SH, Hegde M, Kim J, Wang X, Jayaraman A, Wood TK. 2012. Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device. Nature Communications. 3:613.

Javaherdashti R, Raman RKS, Panter C, Pereloma EV. 2006. Microbiologically assisted stress corrosion cracking of carbon steel in mixed and pures cultures of sulfate reducing bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation. 58:27–35.

Jin J, Guan Y. 2014. The mutual co-regulation of extracellular polymeric substances and iron ions in biocorrosion of cast iron pipes. Bioresource Technology. 169:387–394.

Korenblum E, Goulart FRV, Rodrigues IA, Abreu F, Lins U, Alves PB, Blank AF, Voloni E, Sebastián GV, Alviano DS, Alviano CS, Seldin L. 2013. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. ABM Express. 3:44.

Kumar P, Mittal KL. (Eds). 1999. Handbook of Microemulsion Science and Technology. New York: Marcel Dekker. 864p.

Kunle O. 2003 Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. Phytomedicine. 10:59.

Langevin D. 1988. Microemulsions. Accounts of Chemical Research. 21: 255.

Lambert RJW, Sjandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 2001. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453–462.

Lenhart TR, Duncan KE, Beech IB, Sunner JA, Smith W, Boifay V, Biri B, Suflita JM. 2014. Identification and characterization of microbial biofilm communities associated with corroded oil pipeline surfaces. *Biofouling*. 7:823–835.

Li XZ, Hauer B, Rosche B. 2007. Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76:1255–1262.

Liengen T, Basseguy R, Feron D, Beech I. 2014. *Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications*. European Federation of Corrosion Publications: Woodhead Publishing. 66:446p.

Loto CA, Loto RT, Popoola API. 2011. Electrode potential monitoring of effect of plants extracts addition on the electrochemical corrosion behaviour of mild steel reinforcement in concrete. *International Journal of Electrochemical Science*. 6:3452–3465.

Lowe KL, Bogan BW, Sullivan WR, Cruz KMH, Lamb BM, Kilbane JJ. 2004. Development of an environmentally benign microbial inhibitor to control internal pipeline corrosion. *Eleventh Quarter Report*. 2:54.

Macêdo, JAB. 2000. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. *Revista Fármacos & Medicamentos*. 2:19–24.

Melo JO, Bitencourt TA, Fachin AL, Cruz EMO, Jesus HCR, Alves PB, Arrigoni-Blank MF, Franca SC, Belebani RO, Fernandes RPM, Blank AF, Scher R. 2013. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Tropica*. 128:110–115.

Muthukrishnan P, Prakash P, Ilayaraja M, Jeyaprabha B, Shankar K. 2015. Effect of acidified *Feronia elephantum* leaf extract on the corrosion behavior of mild steel. *Metallurgical and Materials Transactions B*. 46:1448–1460.

NACE – Laboratory Corrosion Testing of Metals in Static Chemical Cleaning Solution at Tempera. 2000. Document number: TM-0193.

Nelson DL, Cox MM. 2012. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman. 6th Edition. 1340p.

Nicolaou KC, Hale CRH, Nilewski C, Ioannidou HA. 2012. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. *Chemical Society Reviews*. 41:5185–5238.

Oguzie EE, Oguzie KL, Akalezi CO, Udeze IO, Ogbulie JN, Njoku VO. 2013. Natural products of materials protection: corrosion and microbial growth inhibition using capsicum frutescens biomass extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.

1:214–225.

Oliveira AG, Scarpa MV, Chaimovich HJ. 1997. *Pharmacy Science*. 86: 616.

Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. 2004. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*. 27:131–138.

Paul BK, Moulik SP. 2001. Use and applications of microemulsions. *Curr. Sci.*80:900–2001.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez MD, Villar, A. 2001 *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76:201–214.

Pimenta M, Fernandes LS, Pereira UJ, Garcia LS, Leal SR, Leitão SG, Salimena FRG, Viccini LF, Peixoto PH. 2007. Floração, germinação e estaquia em espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 2:211–220.

Prasad R. 2000. *Corrosion*. Houston: NACE, 390p.

Raja PB, Sethuraman MG. 2008. Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media — A review. *Materials Letters*. 62:113–116.

Rocha JC, Cunha JAPG, D’Elia E. 2010. Corrosion inhibition of carbon steel in hydrochloric acid solution by fruit peel aqueous extracts. *Corrosion Science*. 52:2341.

Sarikurkcü C, Ozer MS, Eskici M, Tepe B, Can S, Mete E. 2010. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*. 48:1801–1805.

Sarrazin SLF, Oliveira RB, Barata LES, Mourão RHV. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry*. 134:1474–1478.

Silva TF, Vollú RE, Jurelevicius D, Alviano DS, Alviano CS, Blank AF, Seldin L. 2013. Does the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect its endophytic microbial community? *BMC Microbiology*. 13:29.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science Technology*. 43:573–583.

Stitt M. 2013. Systems-integration of plant metabolism: means, motive and opportunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 16:381–388.

Sutherland, IW. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamics microbial environment. *Trends in Microbiology*. 5:222–227.

Terblanché FC, Kornelius G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia*

- (Verbenaceae): a literature review. *Journal of Essential Oil Research*. 5:471–485.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. *Microbiologia*. São Paulo: Artmed. 10^a ed. 964p.
- Umoren SA, Eduok UM, Israel AU, Obot IB, Solomon MM. 2012. Coconut coir dust extract: a novel eco-friendly corrosion inhibitor for Al in HCl solutions. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 5:303–313.
- Van den Dool LH, Kratz PHJ. 1963. Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 11:463.
- Videla, HA. 2003. *Biocorrosão, biofouling e biodegradação de materiais*. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA; 148p.
- Videla HA, Herrera LK. 2004. Biocorrosion. *In Studies in Surface Science and Catalysis*. Elsevier B.V; 151p.
- Videla HA, Herrera LK. 2009. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63:896–900.
- Viuda-Martos M, Mohamady MA, Fernández-López J, ElRazik KAA, Omer EA, Pérez-Alvarez JA, Sendra E. 2011. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatics plants. *Food Control*. 22:1715–1722.
- Viuda-Martos M, El Gendy NGS, Sendra E, Fernández-López J, ElRazik KAA, El-Sayed A, Pérez-Alvarez JA. 2010. Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:9063–9070.
- Zein S, Awada S, Al-Hajje A, Rachidi S, Salameh P, Kanaan H. 2012. Variation of thymol, carvacrol and thymoquinone production from wild and cultivated *Origanum syriacum* of South Lebanon. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6:1692–1696.
- Zhang P, Xu D, Li Y, Yang K, Gu T. 2015. Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. *Bioelectrochemistry*. 101:14–21.
- Winsor PA. 1948. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. *Transactions of the Faraday Society*. 44:376-98.
- Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U. 2013. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nature Protocols*. 8:1535-1550.

Figures:Table 1 – Chemical composition of *L. gracilis* Schauer essential oil obtained by GC/MS. * Retention index.

Compound	*R.I	Total (%)
Hexenol<(4Z)->	871	1.46
Thujene< α ->	924	1.80
Pinene< α ->	932	0.44
Pinene< β ->	974	0.40
Myrcene	988	4.29
Terpinene< α ->	1014	1.68
Cymene<O->	1022	4.50
Sylvestrene	1025	0.46
Ocymene<(E)- β ->	1044	0.33
Terpinene< γ ->	1054	14.97
Sabinene Hidrate <cis->	1065	0.45
Terpineolene	1086	1.14
Epoxymyrcene<6,7->	1090	0.14
Linalool	1095	0.70
Menthatriene	1108	0.03
Terpinen-4-ol	1174	4.67
Thymol , methylether	1232	0.59
Carvacrol,methylether	1241	0.56
Carvacrol	1298	49.51
Thymolacetate	1349	0.01
Carvacrolacetate	1370	0.14
<u>Total Chemical Class</u>		
Benzenoides	-	55.90
Monoterpenoides	-	33.80
Sesquiterpenoides	-	10.2
Total		99.9

Table 2 – MPN for bacteria existing in the ballast ship tank.

Microorganism	MPN of cells (cells/100mL)
Total aerobic bacteria	3.5×10^5
Total anaerobic bacteria	8.0×10^5
Sulfate reducing bacteria (SRB)	3.5×10^5
Iron oxidizing bacteria (IOB)	2.0×10^5

Table 3 – Kinetic parameters obtained from polarization curves for the AISI 1020 carbon steel in salting solution (0.5 M NaCl) in presence of *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion

Substances	b_a (mV/dec)	b_c (mV/dec)	E_{corr} (mV/Ag/ AgCl)	I_{corr} (A/cm ² x 10 ⁻⁶)	Corrosion rate (mm/year)	IE (%)
Control	16.846	28.762	-780.73	7.23	0.0120737	-
Microemulsion	119.91	217.18	-751.07	5.10	0.0040430	29.46

Table 4 – Impedance electrochemical parameters obtained for the AISI 1020 carbon steel in salting solution (0.5 M NaCl) in presence and absence of *L. gracilis* Schauer essential oil.

Substances	R_{ct} (Ω cm ²)	Y_0 (μ Mho cm ⁻²)	C_{dl} (μ F cm ⁻²)	n (%)
Control	358.74	1.128	99.31	-
Microemulsion	416.46	3.775	99.25	14.0%

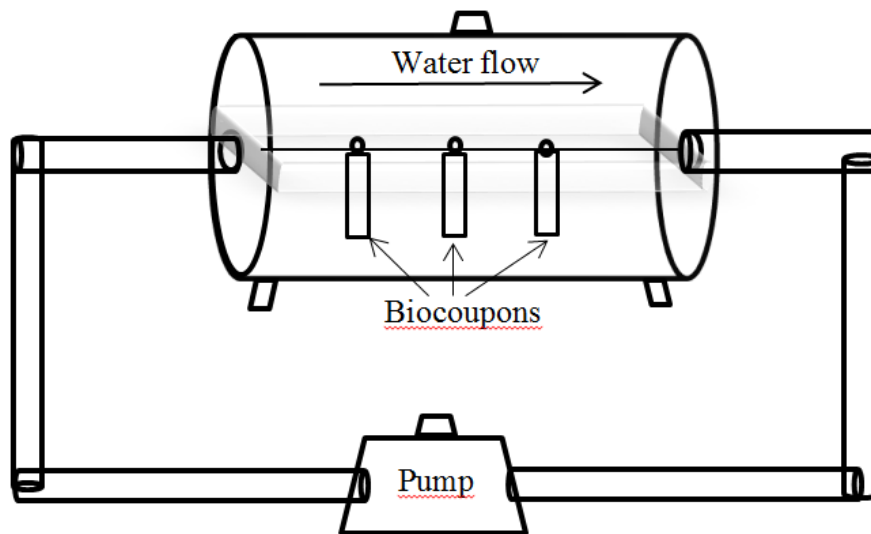


Figure 1 - Schematic of the dynamic system apparatus used for the biofilm formation on AISI 1020 carbon steel: system with circulation of water used for pumping during the experiments with the biocoupons.

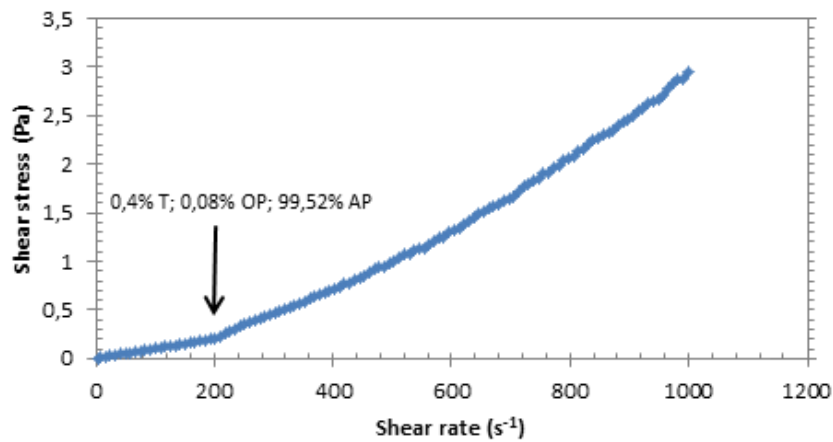


Figure 2 - Shear stress versus shear rate for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion. The scanning was carried out from 0 to 1000 s^{-1} at 30°C. The arrow indicates the change in the regime flow from laminar to turbulent.

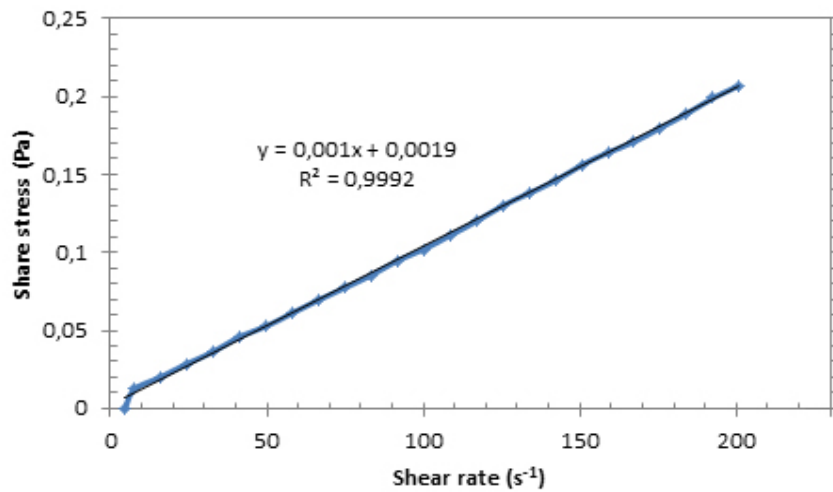


Figure 3 - Shear stress versus shear rate for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion at laminar regime.

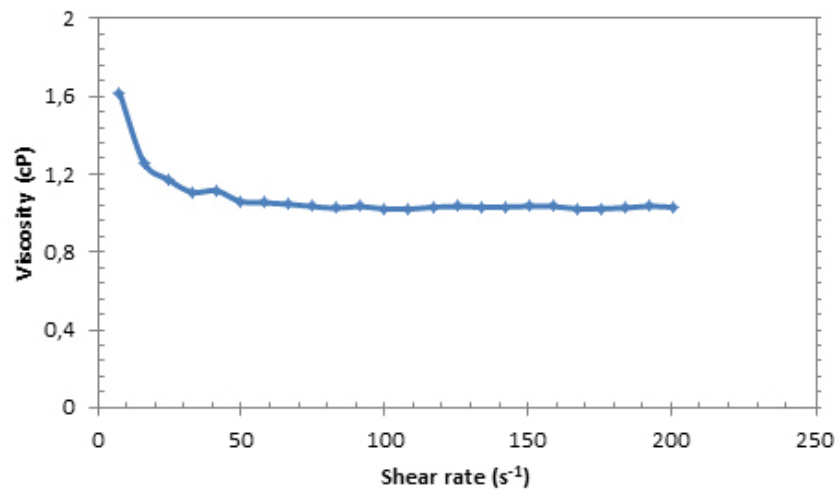


Figure 4 - Viscosity versus shear rate for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion.

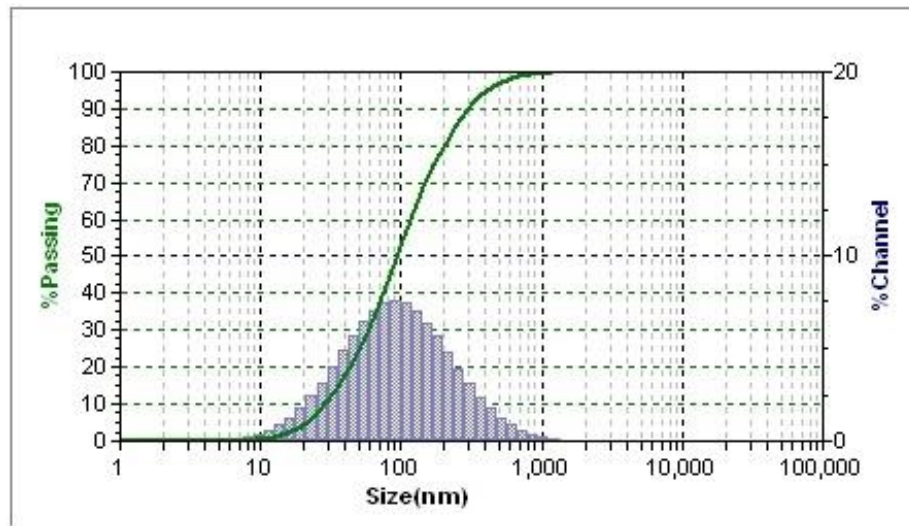


Figure 5 - Drop size distribution for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion at point OP = 0.08% and AP = 99.52%. The average drop size was 93.2 nm.

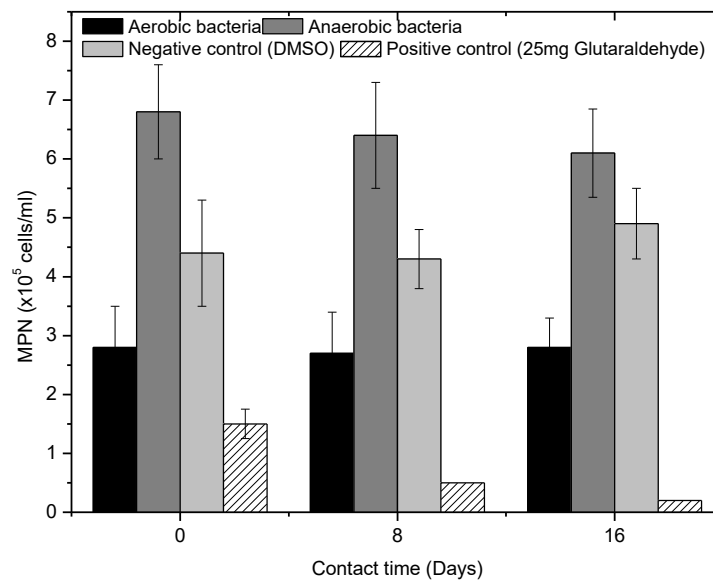


Figure 6 - Biocide activity for the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion on aerobic and anaerobic bacteria. Negative control: biofilm in contact with DMSO. Positive control: 25.0 mg glutaraldehyde.

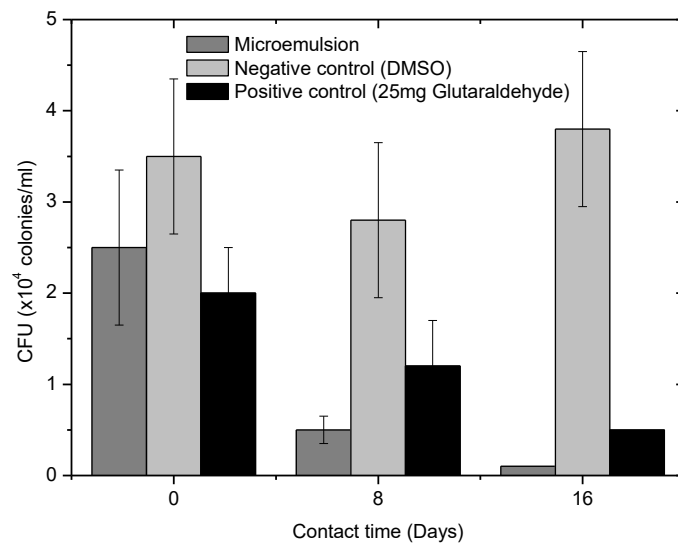


Figure 7 - Effect of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion on CFU. The biofilms were obtained after seven days in the dynamic system. Trials were performed *in vitro* using the AISI 1020 carbon steel. Negative control: biofilm in contact with DMSO. Positive control: 25.0 mg glutaraldehyde.

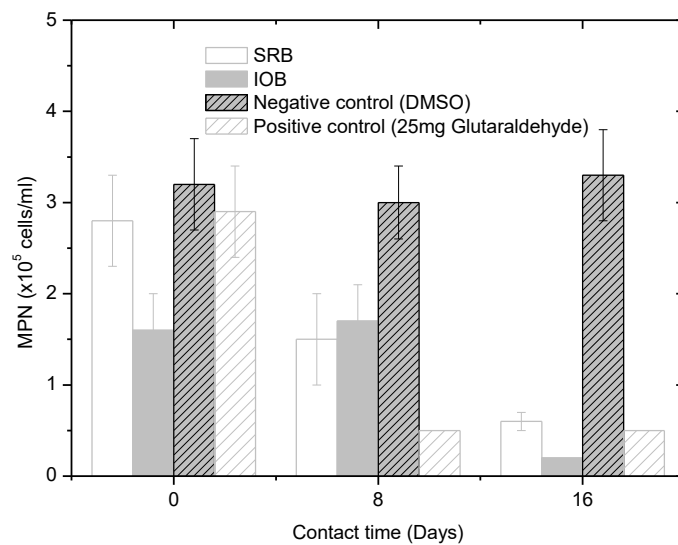


Figure 8 - Effect of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion on MPN for SRB and IOB under different periods of contact: 0, 8 and 16 days. The biofilms were obtained in the dynamic system and runs were performed *in vitro* using AISI 1020 carbon steel. Negative control: biofilm in contact with DMSO. Positive control: 25.0 mg of glutaraldehyde.

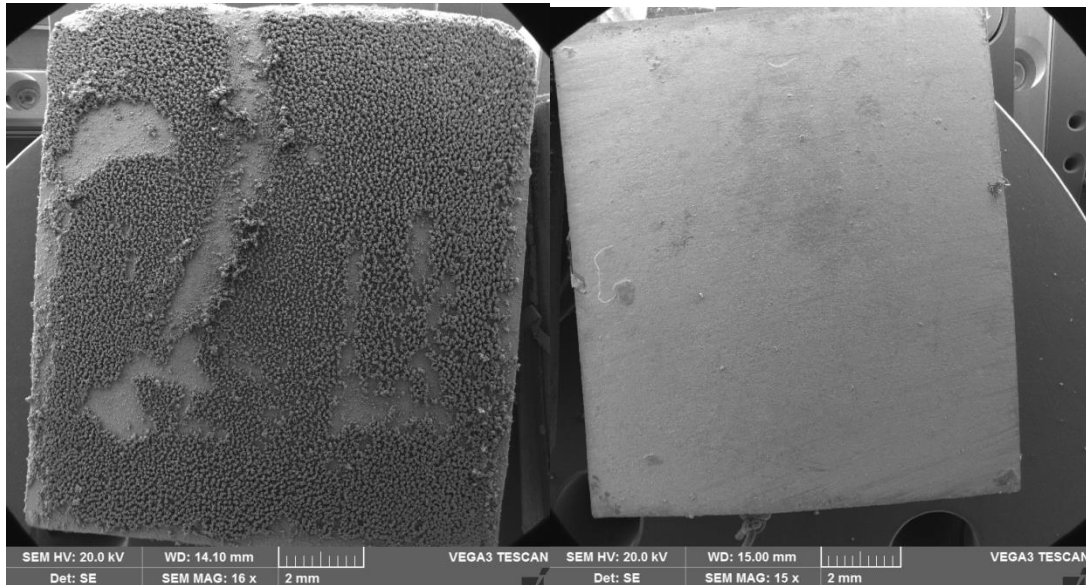


Figure 9 - Micrographs showing the effect of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion over the biofilms formed on the AISI 1020 carbon steel in dynamic system. Left: Biofilm without addition of microemulsion (2x). Right: Biofilm in presence of microemulsion after 16 days.

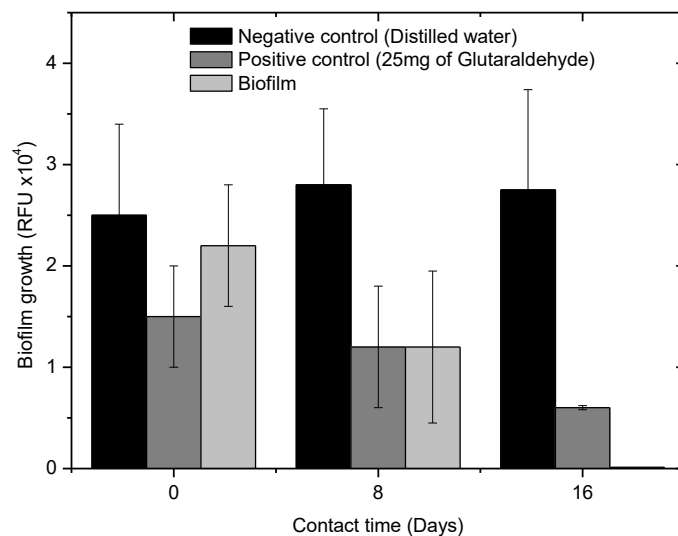


Figure 10 – Effect of *L. gracilis* Schauer essential oil over biofilm under different contact times. Data are in Relative Fluorescence Unit (RFL) at 510 nm after biofilm pickling.

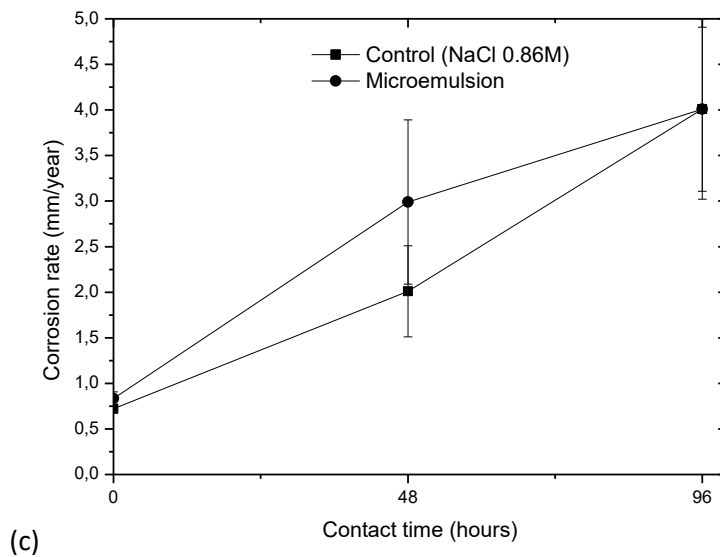
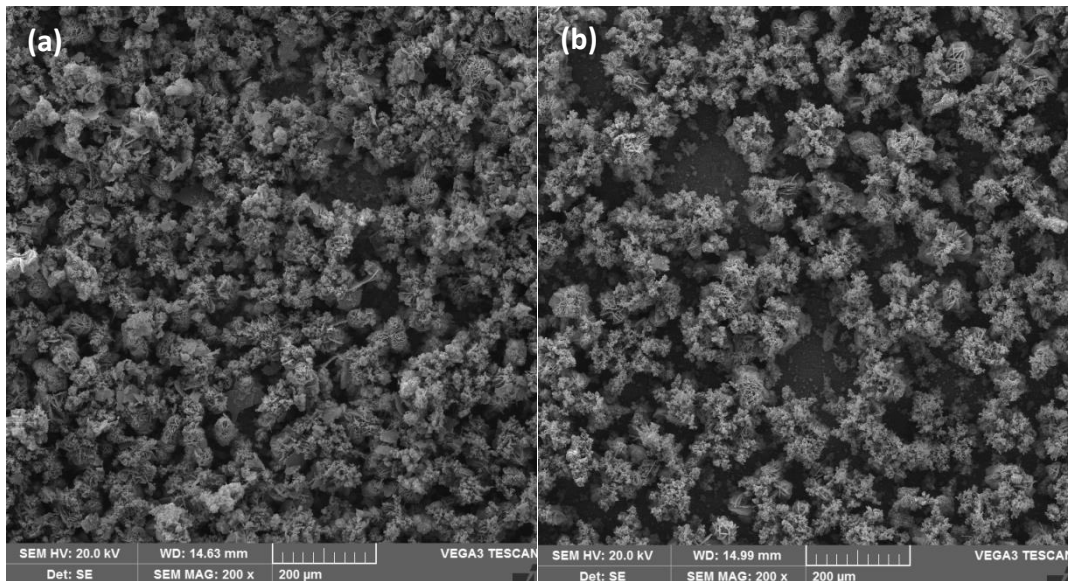


Figure 11 – Antibiofouling activity of *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion: (a) micrograph on the AISI 1020 carbon steel biocoupon surface after 0 hours of contact (control) and (b) after 96 hours contact (200x). (c) corrosion rate for each time assayed ($p < 0.05$).

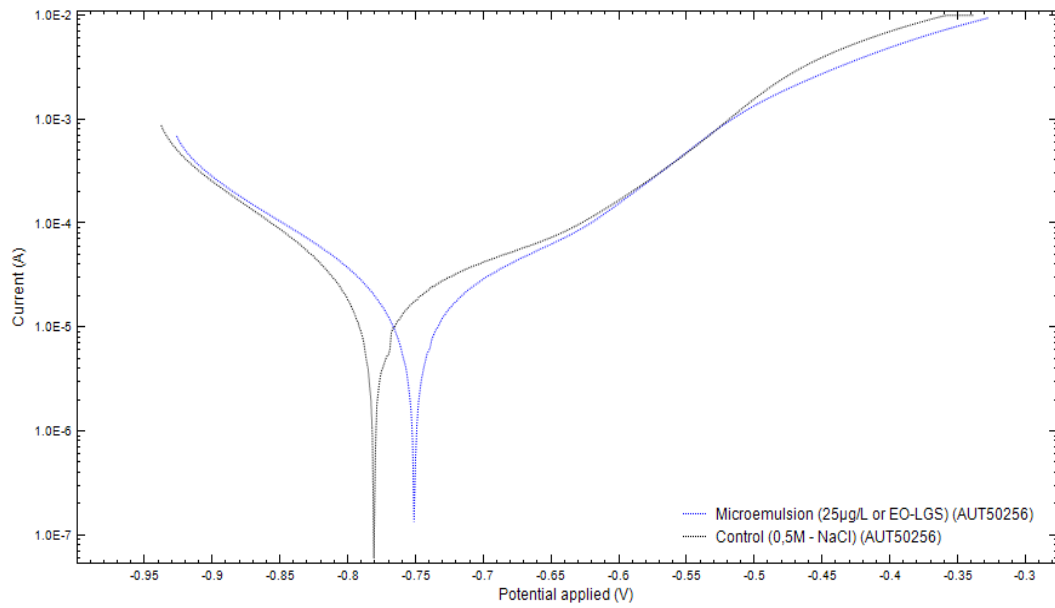


Figure 12 – Polarization curves for AISI 1020 carbon steel biocoupons with the biofilms in salt solution (0.5 M NaCl) in presence and absence of *L. gracilis* Schauer essential oil.

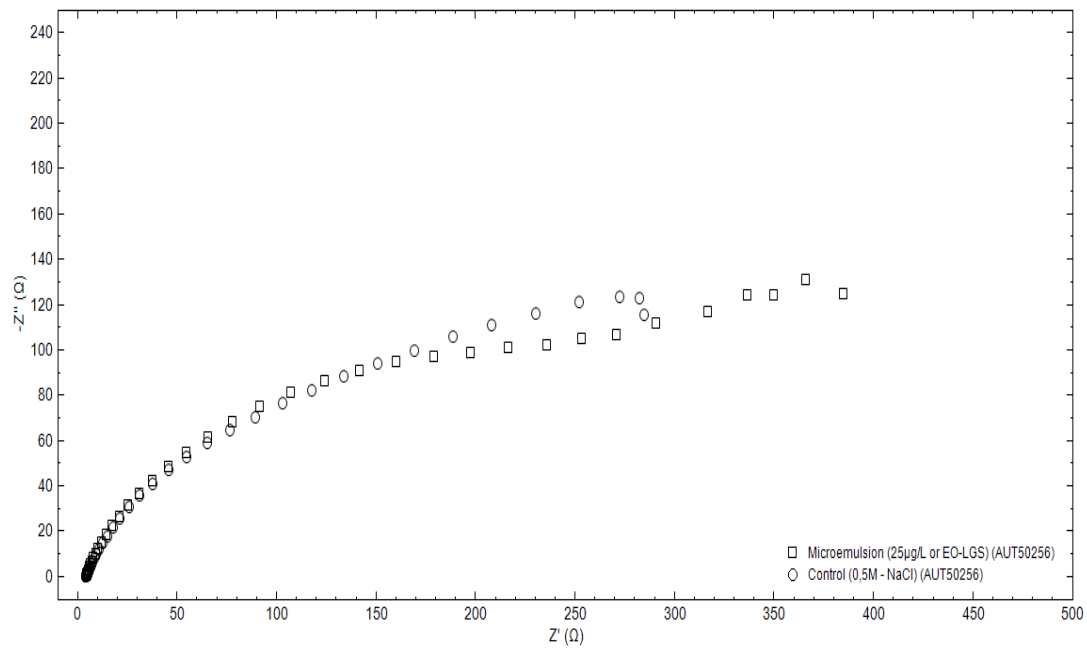


Figure 13 – Electrochemical impedance diagrams for the AISI 1020 carbon steel in salt solution (0.5M NaCl) in presence *L. gracilis* Schauer essential oil emulsion.

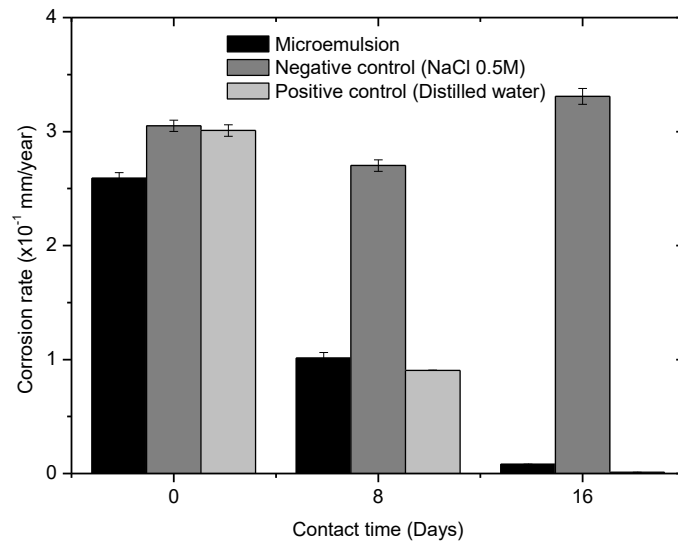


Figure 14 – Effect of the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion over the corrosion rate of AISI 2010 carbon steel. Assays were performed in triplicate for treatment. Negative control: distilled water. Positive control: salting solution (0.086M NaCl) with biofilm.

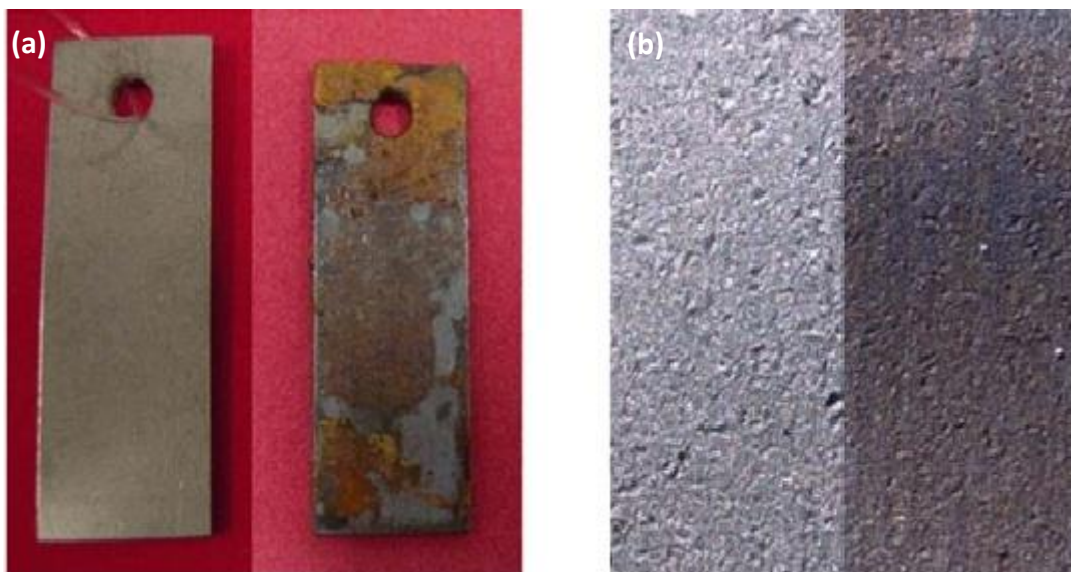


Figure 15 – Surface of the AISI 1020 carbon steel biocoupons: (a) sanded biocoupons before (left) and after 16 days in the dynamic system. (b) Micrographs (10x) of AISI 1020 carbon steel biocoupons surface before (control, left) and after 16 days of contact to the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion after biofilm pickling (right).

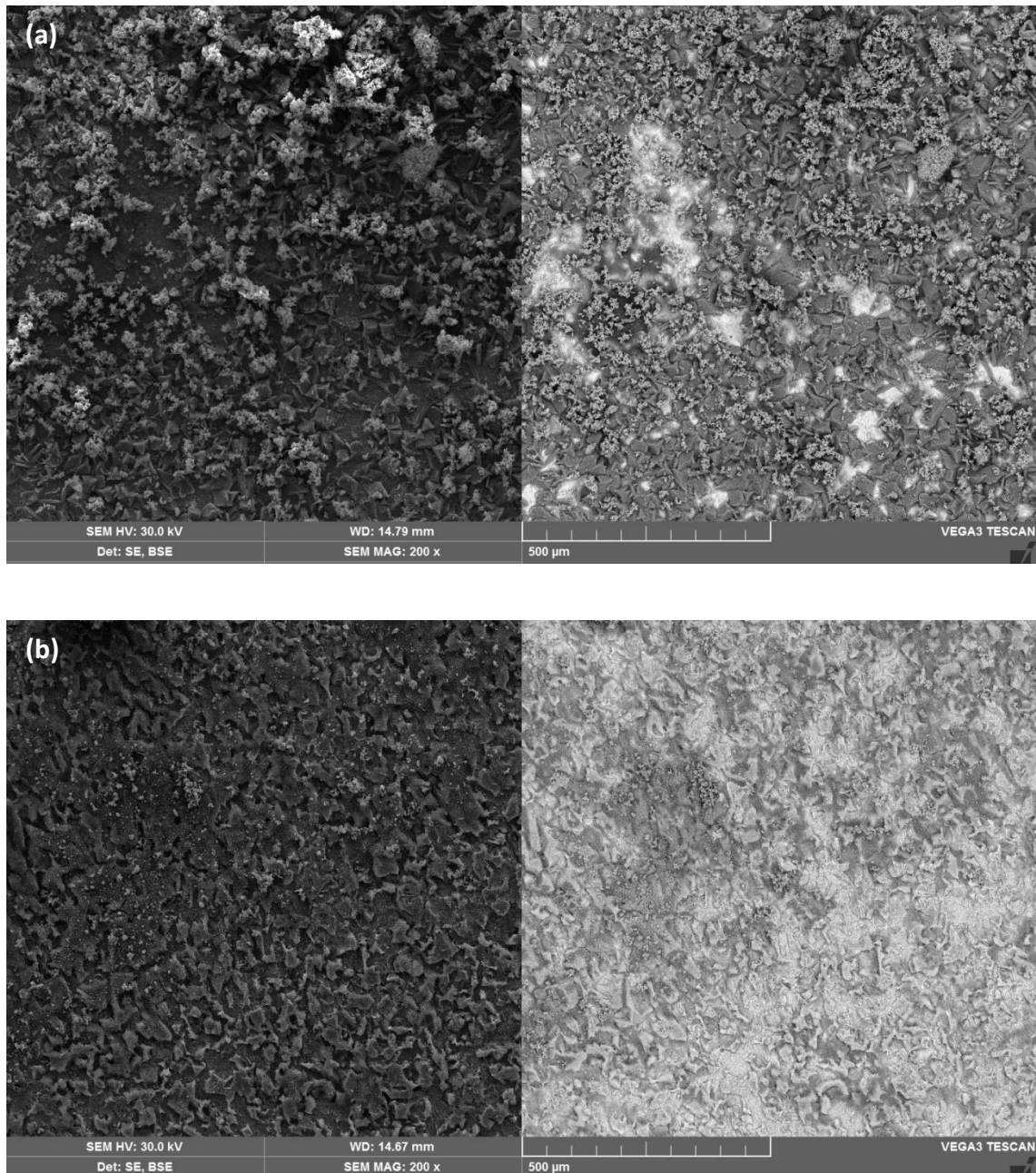


Figure 16 – Biocupons surface analysis: (a) micrographs showing the surface (left) and the corrosion product density (right) before (control) and (b) after 16 days contact to the *L. gracilis* Schauer essential oil microemulsion (200x).

7. Conclusões gerais

Os produtos naturais aqui avaliados demonstraram ter significativa ação antimicrobiana sobre biofilmes geradores da corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A ação preventiva do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer e dos metabólitos de endófitos dessa planta também foi comprovada na formação desse tipo de comunidade microbiana sobre aço carbono AISI 1020, sendo considerados agentes *antibiofouling* eficientes.

A atividade anticorrosiva dessas substâncias naturais mostrou-se diferir em relação à presença ou ausência de biofilmes sobre a superfície do aço. Porém, de forma geral, o óleo essencial bem como os metabólitos de endófitos de *L. gracilis* Schauer foram significativamente eficientes na inibição da corrosão microbiológica.

Os resultados desse trabalho põem os metabólitos de endofíticos de *L. gracilis* Schauer e o óleo essencial desta espécie como excelentes alternativas de biocidas “verdes” em substituição ou não, nesse caso em uso isolado ou em associação, aos biocidas químicos sintéticos amplamente usados na indústria de petróleo e gás.