

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

GABRIELLA DE ORNELAS MENEZES

**CONTROLE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS
PRESENTES EM FLUIDOS DE CORTE UTILIZANDO BIOCIDA E ÓLEOS
ESSENCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso

LONDRINA

2015

GABRIELLA DE ORNELAS MENEZES

**CONTROLE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS
PRESENTES EM FLUIDOS DE CORTE UTILIZANDO BIOCIDA E ÓLEOS
ESSENCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

LONDRINA

2015



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

Controle da formação de biofilme por bactérias presentes em fluidos de corte utilizando biocida e óleos essenciais

por

Gabriella de Ornelas Menezes

Monografia apresentada no dia 26 de novembro de 2015 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____ (aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Prof. Dr. Ajadir Fazolo
(UTFPR)

Prof. Dr. Edson Fontes de Oliveira
(UTFPR)

Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Ligia Flávia Antunes Batista
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

Dedico aos meus pais, Alberto e Cristiane, por acreditar e investir em mim e que mesmo longe geograficamente, se fizeram presente em todo o tempo, sem medir esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por ser meu sustento e me dar força e coragem para encarar essa caminhada. A Ele também por ter presenteado minha vida com pessoas tão especiais.

A meus pais Alberto e Cristiane e minha irmã Mirella, por me passarem segurança e me mostrarem que não estava sozinha e que mesmo distante, demonstraram carinho e cuidado, me encorajando a seguir em frente.

Aos amigos de Santos-SP, que continuaram grandes e bons amigos apesar da distância, saudade e correrias da vida. Em especial à ajuda do David e Isabela.

Aos amigos que a faculdade deu (e que eu não me atrevo a citar nomes). Que time formamos, hein?! Não existem palavras para agradecer cada noite em claro (fossem para estudar ou para festar), cada palavra amiga, cada puxão de orelha e todas as risadas.

As companheiras e amigas de apartamento Aninha, Lari e Lu, por compartilharem os melhores e piores momentos, tornando tudo mais leve e fácil.

As parceiras de laboratório Dani e Ana, pelo apoio e ajuda, sem vocês teria sido muito mais difícil.

A professora e orientadora Kátia Prates, que com muita dedicação e paciência foi essencial para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelo convívio, compreensão e amizade.

Aos professores presentes na banca, Edson Fontes e Ajadir Fazolo, por disponibilizarem atenção para contribuírem neste trabalho. Ao professor Joelmir Borssoi, por ter compartilhado seu conhecimento, ajudando na finalização do trabalho.

A todos os professores que passaram por mim na graduação, vocês foram muito importantes na minha vida acadêmica e cada um, de formas diferentes, marcaram minha vida com seus ensinamentos.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

MENEZES, Gabriella de O. Controle da formação de biofilme por bactérias presentes em fluidos de corte utilizando biocidas e óleos essenciais. 55 p. Monografia (Graduação) – Curso Superior em Bacharelado de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

Fluidos de corte são usados no corte ou usinagem de materiais, sendo uma emulsão formada por óleo e água. A usinagem sem fluido de corte apresenta alta força de corte e altos índices de rugosidade, por isso é necessário seu uso, exercendo papel de refrigeração, lubrificação e limpeza da região de corte. Essa emulsão é suscetível ao crescimento de microrganismos capazes de formar biofilme, que podem contaminar o fluido e causar danos decorrentes dos compostos químicos excretados pelas bactérias. Dessa forma, objetivou-se verificar a capacidade de formação de biofilme por bactérias presentes em fluidos de corte vegetal e mineral e a eficiência de biocidas sintético e naturais (óleos essenciais) no seu controle. Para isso, foram realizadas coletas em uma máquina de fresamento na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Câmpus Cornélio Procópio e as amostras foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura sólido *Plate Count Agar* (PCA). Foi realizado o isolamento das colônias, caracterização morfológica dos isolados e teste de formação de biofilme para bactérias isoladas e associadas. A formação de biofilme foi avaliada pela leitura da densidade óptica a 450nm em um aparelho ELISA e permitiu que as bactérias e associações fossem classificadas em não formadoras, fracas, moderadas ou fortes formadoras. Na segunda etapa desse teste foi acrescido biocida sintético ou óleos essenciais na concentração de 1% e identificou-se a eficiência dos inibidores na redução da formação dos biofilmes. Percebeu-se maior crescimento de bactérias Gram-positivas, 65% no fluido vegetal e 55% no mineral, e na forma e arranjo de estafilococos (40% no fluido vegetal e 22% no mineral) e bacilos (41% no fluido vegetal e 35% no mineral). Houve formação de biofilme independentemente da origem do fluido de corte utilizado, mas quando considerado o crescimento normal do biofilme, sem adição de inibidores, o fluido de origem mineral foi mais suscetível à presença de moderadas formadoras de biofilme. Houve diferença considerável entre as bactérias na forma individual ou em associações tanto na formação quanto na inibição do biofilme para ambos os fluidos. No fluido mineral, o resultado do biocida sintético foi semelhante ao do óleo essencial de cravo para inibição da formação de biofilme e foram os mais eficientes nesta função, apresentando 100% de bactérias não formadoras de biofilme. No fluido vegetal, o biocida sintético foi o mais eficiente para redução da formação do biofilme, 83% não formadoras e 17% fracas formadoras para individuais e duplas e 100% não formadoras em trios. Os óleos essenciais só mostraram eficiência na redução do biofilme no fluido vegetal para associações de trios. Para redução da formação de biofilme, o biocida sintético se mostrou mais eficiente nos dois fluidos avaliados, embora o uso de óleos essenciais seja preferível por ser retirado de fonte natural/renovável.

Palavras-chave: Usinagem. Microrganismos. Biocida sintético. Óleo essencial de cravo. Óleo essencial de alfavaca.

ABSTRACT

MENEZES, Gabriella de O. Control of biofilm formation by bacteria in cutting fluids using biocides and essential oils. 56f. Monography (Graduation) - Bachelors Degree in Environmental Engineering. Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2015.

Cutting fluid is any kind of fluid used for cutting or machining materials, being also an emulsion formed by oil and water. Machining without cutting fluid presents a high cutting force and high levels of roughness, so the use of cutting fluids is required for cooling, lubrication and cleaning of the part. This emulsion is susceptible to the growth of microorganisms capable of forming biofilm, which may contaminate the fluid and cause damage resulting from chemical compounds excreted by the bacteria. Thus, the objective was to verify biofilm formation capacity by bacteria present in cutting fluids as much as the efficiency of synthetic and natural biocides to inhibit biofilm formation. For this, samples were taken on a milling machine at the Federal University of Technology - Paraná (UTFPR) – Cornélio Procópio Campus and inoculated in Petri dishes with Plate Count Agar (PCA) solid growth medium. The isolation of the colonies, morphological characterization and Gram's staining and biofilm formation test for isolated and associated bacteria were performed. The biofilm formation occurred by reading the optical density at 450nm in an ELISA system and it enabled the bacteria and associations to be classified as non-forming, weak, moderate or strong forming. In the second stage of the test, synthetic biocide or essential oils in 1% concentration were added and the effectiveness of inhibitors in reducing the formation of biofilms was identified. In larger quantities, the growth of Gram-positive bacteria, 65% in vegetable fluid and 55% in mineral, and in the shape and arrangement of staphylococci (40% in vegetable fluid and 22% in mineral) and bacilli (41% in vegetable fluid and 35% in mineral) was noted. There was biofilm formation regardless of the used cutting fluid origin, but when considered the normal biofilm growth, without the addition of inhibitors, the mineral fluid was more susceptible to the presence of moderate biofilm forming bacteria. There was no significant difference between individual bacteria or associations both in biofilm formation as in its inhibition for both fluids. In the mineral fluid, the result of the synthetic biocide was similar to the clove essential oil for inhibiting biofilm formation and they were the most effective in this role, 100% non-biofilm-forming. In the vegetable fluid, the synthetic biocide was the most efficient for reducing biofilm formation, 83% non-forming and 17% weak forming for single and pairs and 100% non-forming in trios. The essential oils have only showed efficiency in reducing the biofilm in the vegetable fluid for trios associations. For the reduction of biofilm formation, the synthetic biocide was more efficient in both fluids, although the use of essential oils is preferred since it is removed from a natural/renewable source.

Keywords: Machining. Microorganisms. Isolates. Clove essential oil. Basil essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de adesão de um biofilme. (1) Adsorção. (2) Adesão. (3) Formação de microcolônias. (4) Maturação/formação da EPS. (5) Adesão de outros microrganismos e liberação de micro-colônias.....	20
Figura 2 - Máquina de fresamento. (a) Visão lateral do local de usinagem das peças. (b) Detalhe do reservatório onde se realizavam as coletas de amostra.....	25
Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos microbiológicos.....	26
Figura 4 - Processo de inoculação de amostras em placas de Petri.....	27
Figura 5 - Técnica de esgotamento - direção da semeadura por esgotamento.....	28
Figura 6 - Preparo da suspensão bacteriana pela escala de McFarland. (a) Primeiro tubo contendo solução McFarland escala nº0,5 e segundo tubo com solução salina. (b) Alçadas na colônia de bactérias. (c) Inserção no tubo contendo solução salina. (d) Homogeneização da mistura e repetição do processo até que a turbidez fosse equivalente a do tubo contendo a escala McFarland..	30
Figura 7 - Preenchimento dos poços da placa utilizando a suspensão bacteriana.....	31
Figura 8 - Distribuição das bactérias e suas associações nos poços da placa.....	31
Figura 9 - Placa com poços U preenchidos com meio BHI e solução McFarland nº0,5 das bactérias e de suas associações.....	32
Figura 10 - Placas com poços U preenchidos com cristal violeta.....	32
Figura 11 - Leitura da placa de poços U em aparelho ELISA.....	33
Figura 12 – Caracterização morfotintorial das bactérias presentes em fluido de corte mineral e vegetal.....	37
Figura 13 - (a) Isolamento de bactérias. (b) Resultado de teste morfotintorial de Gram. (B1) Resultado de Gram Negativo. (B2) Resultado de Gram Positivo.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado de teste morfotintorial das bactérias selecionadas para teste de formação de biofilme, expresso em porcentagem.....	38
Tabela 2 - Análise do crescimento das bactérias individuais e em associações de duas ou três bactérias. As colunas representam os diferentes tratamentos (CN: crescimento normal; BIO: biocida; CRA: óleo essencial de cravo; ALF: óleo essencial de alfavaca; AG: água) e as linhas são as respostas quanto à formação de biofilme (NF: não formadora; FRF: fracamente formadora; MF: moderadamente formadora; FF: fortemente formadora), em porcentagem (%)......	40
Tabela 3 - Resultados obtidos com a análise de variância para a formação de biofilme no fluido mineral.....	44
Tabela 4 - Análise de significância dos inibidores nas bactérias e das bactérias nos inibidores em fluido mineral.....	45
Tabela 5 – Resultados obtidos com a análise de variância para a formação de biofilme no fluido vegetal.....	47
Tabela 6 - Análise de significância dos inibidores nas bactérias e das bactérias nos inibidores em fluido vegetal.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Água
ALF	Óleo Essencial de Alfavaca
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BIO	Biocida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CN	Crescimento normal
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substance</i>
Fc	F calculado
FF	Fortemente Formadora
FRF	Fracamente Formadora
GL	Grau de Liberdade
MF	Moderadamente Formadora
NF	Não Formadora
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
QM	Quadrados Médios
pH	Potencial Hidrogeniônico
SQ	Soma dos Quadrados
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL	15
3.2 FLUIDOS DE CORTE.....	17
3.3 BIOFILMES MICROBIANOS	18
3.4 BIOFILMES INDUSTRIAIS.....	21
3.5 BIOCIDAS E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	25
4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	26
4.2.1 <i>Inoculação</i>	27
4.2.2 <i>Isolamento Bacteriano</i>	27
4.2.3 <i>Caracterização Morfotintorial dos Isolados Bacterianos</i>	28
4.2.4 <i>Teste de Formação de Biofilme</i>	29
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	37
5.2 TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	40
5.2.1 <i>Análise Estatística da Formação de Biofilme em Fluido Mineral</i>	44
5.2.2 <i>Análise Estatística da Formação de Biofilme em Fluido Vegetal</i>	47
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são encontrados em qualquer habitat capaz de sustentar a vida. Dentre eles se destacam as bactérias, as quais podem viver livremente no ambiente (organismos planctônicos) ou aderidas em superfícies (biofilmes). Os biofilmes são uma forma comum de crescimento bacteriano na natureza. Além de oferecerem proteção contra compostos químicos nocivos, constituem uma barreira contra predação por outros microrganismos, como também impedem que as células bacterianas sejam deslocadas a um hábitat menos favorável (BROCK, 2010; TORTORA, 2012).

De acordo com Capelletti (2006), a formação de um biofilme depende de variados eventos, envolvendo desde etapas de adesão até a adaptação dos microrganismos ao suporte. O tipo e disponibilidade dos substratos, que são fonte de energia e nutrientes ao biofilme, além das condições físico-químicas do meio, são fatores que afetam o crescimento microbiano, nesse meio.

Os biofilmes têm sido estudados nos mais diferentes segmentos industriais, onde são os principais causadores de contaminações e responsáveis pelo insucesso de diversos tratamentos convencionais (LUCCHESI, 2006). Os biofilmes que se desenvolvem nos reservatórios de fluidos, podem contaminá-lo e causar danos decorrentes dos compostos químicos excretados pelas bactérias do biofilme.

Segundo Lucchesi (2006), o problema com biofilmes está presente no segmento industrial que usa água e nos sistemas que tenham fluidos em circulação. Para Capelletti (2006), em indústrias, as tubulações e os circuitos de fluido são favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos e formação de biofilmes, destacando-se as que fazem uso de fluido de corte.

O fluido de corte, que pode ter sua origem vegetal, mineral, sintético ou semi-sintético, de acordo com Lucchesi (2006), pode ser definido como qualquer fluido que seja usado para corte ou usinagem de metais ou outros materiais, sendo uma emulsão formada por óleo e água altamente poluente e suscetível ao ataque de microrganismos.

De acordo com Gonçalves (2013), é necessário que o fluido desempenhe as funções de refrigeração, lubrificação e limpeza da região onde a peça está sendo usinada, e os fluidos solúveis em água desenvolvem as três funções.

Para Grub (2013), por possuírem nutrientes em sua composição, os fluidos são facilmente contaminados por microrganismos que utilizam esses compostos como matéria prima em suas atividades fisiológicas. Lucchesi (2012) acrescenta ainda que a presença de água, a temperatura, o local de armazenagem e a falta de boas práticas de manutenção e controle potencializam o crescimento dos microrganismos nos fluidos.

Segundo Lucchesi (2006), a contaminação microbiana é o que leva a indústria de usinagem de metais a descartar o fluido de corte. De acordo com Capelletti (2006), métodos de limpeza inadequados que não eliminam totalmente os microrganismos aderidos aos tanques e tubulações, rapidamente podem recontaminar o sistema.

Dessa forma, para controlar as contaminações por biofilmes em fluidos de corte podem ser utilizados antissépticos e antibióticos, que atuam sobre um ou mais grupos de microrganismos (CAETANO et al., 2011). Segundo Capelletti (2006) e Millezi (2012), estratégias de controle de biofilmes são investigadas com intuito de retardar, reduzir ou eliminar a sua formação nos equipamentos.

Capelletti (2006) afirma que a aditivação com biocidas se revela imprescindível para garantir a utilização do fluido em longo prazo, com maior vida útil. Nesse contexto, os óleos essenciais têm sido pesquisados como novas ferramentas para aplicabilidade nas indústrias para controle de bactérias (MILLEZI, 2012).

Portanto, para estudo da contaminação dos fluidos, é importante considerar os microrganismos aderidos. Dessa forma, neste trabalho foi analisada a capacidade de formação de biofilmes por bactérias presentes em fluidos de corte de origem vegetal e mineral e a eficiência de agentes antimicrobianos na sua inibição.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o controle da formação de biofilme por bactérias presentes em fluido de corte de origem vegetal e mineral utilizando biocida sintético e óleos essenciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar morfológicamente as bactérias que crescem em fluidos de corte vegetal e mineral.
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme de bactérias isoladas e de suas associações.
- Analisar o efeito do tipo de fluido (vegetal ou mineral) sobre a eficiência inibitória do biocida sintético e os óleos essenciais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

A demanda mundial anual de fluidos de corte é estimada em mais de 2 bilhões de litros e, pela diluição geram até 10 vezes mais resíduos (CHENG et al., 2005). Nas indústrias do Reino Unido, o custo de disposição é estimado em 16 milhões de euros por ano (CHENG et al., 2005). No Brasil, Lucchesi (2012) afirma que em 2009, a Brasquip Ambiental S. A., empresa do Estado de São Paulo, registrou o descarte de mais de oito mil toneladas da emulsão óleo/água, sendo que o custo estimado variou entre R\$280,00 e R\$430,00 por tonelada, de acordo com a formulação do fluido e do processo utilizado.

No segmento de usinagem de metais que utiliza fluido de corte, a contaminação por biofilmes constantemente resulta em alterações físico-químicas na emulsão óleo/água, o que leva a empresa a descartar grandes quantidades do fluido, causando sérios problemas ambientais e elevado custo com a reposição desta emulsão (RUNGE e DUARTE, 1990).

As questões ambientais têm-se tornado cada vez mais importantes dentro dos processos produtivos, junto com aspectos econômicos e tecnológicos, e, levando-se em conta a demanda do fluido de corte, existe a necessidade de aumentar seu tempo de vida útil para evitar o descarte prematuro (MARCELINO, 2013).

Durante o processo de usinagem, o fluido de corte é uma das principais causas de poluição ambiental, uma vez que provocam importantes impactos tais como emissão de gases tóxicos, resíduos sólidos e efluentes líquidos oleosos perigosos, os quais podem poluir os recursos hídricos, o solo e o ar. Além disso, o fluido de corte também polui com vazamentos durante armazenagem e transporte, além de representar ameaça à saúde do trabalhador, uma vez que podem causar doenças pulmonares e irritações na pele (TAN et al., 2002; IGNÁCIO, 1998; TEIXEIRA, 2007 apud GRUB, 2013).

De acordo com Lucchesi (2006), a Revista Meio Ambiente publicou em 2001 que grande quantidade de fluido de corte é utilizada para usinagem de metais, e o principal problema que a contaminação do fluido por biofilmes acarreta é o alto custo para troca de emulsão e descarte do fluido contaminado. O impacto do descarte no ambiente de uma tonelada/dia de óleo usado equivale ao lançamento de esgoto doméstico proveniente de uma população de 40 mil habitantes, enquanto a queima do óleo sem prévio tratamento gera emissão de óxidos metálicos e gases tóxicos no ar.

Segundo Runge e Duarte (1990), em grandes empresas, o fluido contaminado pode levar à perda de produtividade, gastos extras com troca de fluido, problemas com qualidade do produto acabado, de saúde dos trabalhadores e ambientais ligados ao seu descarte. Como o principal motivo para se descartar uma emulsão de óleo e água é a contaminação microbiana, Lucchesi (2012) afirma que uma maneira de contornar o problema é abordá-lo de forma sistemática.

O controle da contaminação microbiana dos fluidos é importante pela tendência mundial de gerar produtos menos tóxicos à saúde e ao meio ambiente, sendo que os produtos biodegradáveis contribuem para o aumento da contaminação por microrganismo e, conseqüentemente, agrava, em parte, o problema de controle microbiano dos fluidos de corte (TAKAHASHI, 2012 apud GRUB, 2013).

Para Lucchesi (2006), seria ideal que o processo fosse monitorado e que os equipamentos e tubulações fossem projetados para dificultar a formação do biofilme, com menor número de curvas e cotovelos nas tubulações, com materiais de fácil limpeza, desinfecção e manutenção, bem como introdução de aberturas que facilitassem a remoção do biofilme, quando fossem formados.

Ainda segundo Lucchesi (2012), o controle de contaminação industrial é fundamental para empresas de diversas atividades, contribuindo para diminuir gastos com reprocesso de produtos acabados, troca prematura de materiais e equipamentos, entre outros problemas. O controle da contaminação por biofilmes pode ser baseado nas seguintes bases: implantação das boas práticas de manutenção e controle; definição do agente de desinfecção mais adequado para o processo; e a implantação de cronograma de limpeza e sanitização eficaz para a área fabril.

3.2 FLUIDOS DE CORTE

Fluido de corte é qualquer fluido utilizado para o corte ou usinagem de metais ou outros materiais, sendo composto por óleo mineral, vegetal, sintético ou semi-sintético e água (RUNGE e DUARTE, 1990), ou suas combinações, com objetivo de aumentar a lubrificação e umectação (SILLIMAN, 1992). O óleo mais utilizado no sistema de usinagem é o semi-sintético (RUNGE e DUARTE, 1990)

Para Muniz (2008) e Gonçalves (2013), o fluido de corte é insumo ao processo de usinagem, auxiliando a ferramenta de corte a retirar volume maior de material aumentando sua vida útil. O fluido exerce três funções principais: refrigeração, lubrificação e limpeza da região de corte. Quanto à refrigeração, são aplicados à zona de retificação para limitar a geração de calor pela redução de atrito por meio de suas propriedades lubrificantes e reduzindo o aquecimento por condução da energia gerada (IRANI et al., 2005).

De acordo com Muniz (2008), para um fluido de corte apresentar bom desempenho deve ter as seguintes propriedades: alto calor específico, condutividade térmica, propriedades anticorrosivas, antiespumantes, antioxidantes, de lavagem e decantação de cavacos e impurezas, compatibilidade com o meio ambiente, absorção de calor, umectação, antidesgaste, estabilidade do fluido, ausência de odores, ausência de precipitados, viscosidade e transparência.

De acordo com Trent e Wright (2000), o fluido além de melhorar o processo de corte, deve, também, satisfazer outros requisitos: não ser tóxico e não oferecer riscos aos trabalhadores, não ser inflamável, não prejudicar o sistema de lubrificação da máquina-ferramenta, não causar corrosão ou manchas na peça e deve proteger à superfície usinada, tendo o menor custo possível.

Segundo Grub (2013), os fluidos de corte à base de água são susceptíveis ao crescimento de microrganismos, entre eles, as bactérias, que usam dos nutrientes presentes na sua composição para crescerem e reproduzirem, degradando os componentes dos fluidos de corte.

Segundo Capelletti (2006), o circuito do fluido na usinagem de metais passa por várias etapas que envolvem a recirculação e exposição a condições adversas do

processo, como tubulações, canaletas, reservatórios e a própria máquina-ferramenta. Essas estruturas favorecem a instalação e proliferação microbiana em pontos críticos e a formação de biofilmes, que tendem a reduzir a vida útil dos fluidos.

De acordo com Runge e Duarte (1990), a contaminação bacteriana pode resultar na redução do pH, o que causa irritação na pele, corrosão, mau cheiro e quebra da emulsão. Assim, fluidos contaminados sofrem importante redução em sua vida útil em consequência da sua própria degradação acelerada (GRUB, 2013).

De acordo com Lucchesi (2006), pelo histórico do laboratório de microbiologia da IPEL Biocidas, existem registros que aproximadamente 30% dos problemas que envolvem microrganismos estão relacionados a biofilmes industriais, sendo que 35% do total é referente ao segmento do óleo de corte.

3.3 BIOFILMES MICROBIANOS

Segundo Lucchesi (2006), biofilme microbiano é uma associação de células fixadas a superfícies bióticas ou abióticas envolta por uma complexa matriz e que representam mais de 90% dos contaminantes existentes em sistemas aquosos e industriais. Capelletti (2006) define biofilmes como associações de espécies microbianas interdependentes, funcionando de maneira complexa e coordenada como mecanismo de colonização de superfícies, sendo constituídos por microrganismos, materiais poliméricos extracelulares e resíduos do ambiente colonizado.

Segundo Caixeta (2008), a maioria das bactérias vivem em comunidades de diferentes graus de complexidade, compondo, geralmente, um biofilme, que pode ser formado por populações desenvolvidas a partir de uma ou múltiplas espécies. O biofilme aumenta a resistência dos microrganismos e dificulta, assim, a ação de sanificantes.

As bactérias são os microrganismos que mais produzem biofilme, ainda que algumas apresentem maior aptidão que outras. Isso ocorre por seu tamanho reduzido, elevada taxa de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de

substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, tornando-as organismos capazes de colonizar qualquer superfície (CHRISTENSEN e CHARACKLIS, 1990).

Segundo Ceri et al. (1999), as bactérias crescem preferencialmente mais em superfícies do que em forma dispersa. Para Madigan et al. (2010), os biofilmes são um mecanismo de autodefesa microbiano, permitem que as células permaneçam em um nicho favorável, que vivam em estreita associação e são a forma típica de crescimento das células bacterianas na natureza.

Capelletti (2006) afirma que os biofilmes são formados a partir de uma sequência de eventos, de acordo com as etapas de adesão e de adaptação dos microrganismos ao suporte.

Uma das primeiras teorias sobre a formação do biofilme foi descrita por Marshall et al. (1971) e sugere que o processo ocorre em duas fases: uma reversível, em função da adesão do microrganismo na superfície, que ocorre por forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e atração eletrostática. A outra, por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas, ocorrendo interação física da célula com a superfície. Nesse processo, a célula bacteriana é ligada ao substrato pelas fímbrias poliméricas, dificultando a remoção do biofilme.

Segundo a *American Society for Microbiology* (2005 apud Lucchesi, 2006), a formação do biofilme se divide em 5 etapas (Figura 1). 1) adsorção, é reversível e ocorre em segundos. 2) de adesão, é irreversível e ocorre no intervalo de segundos a horas. 3) crescimento e divisão celular, ocorre no período de horas a dias. 4) formação de *Extracellular Polymeric Substances* (EPS), estrutura unificadora e protetora dos biofilmes. 5) de adesão de outros microrganismos e liberação de micro-colônias, pode ocorrer no período de dias a meses.

Após a instalação do biofilme, dentro de dias ou meses, a adesão de outros microrganismos é facilitada, bem como a liberação de novos colonizadores aptos a formar novos biofilmes, os quais se desprendem do biofilme maduro, iniciando novo ciclo (GRUB, 2013).

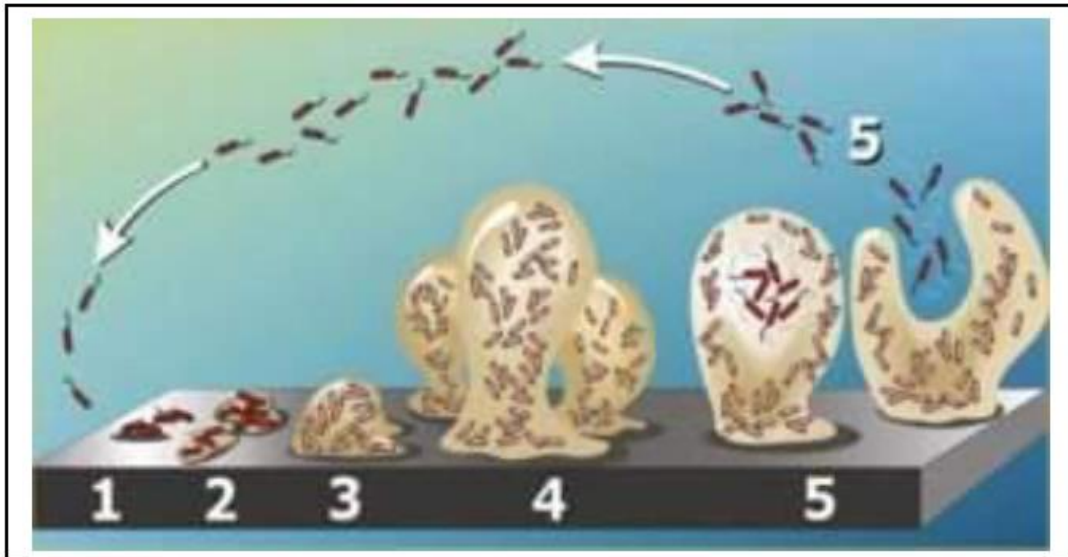


Figura 1 – Etapas de adesão de um biofilme: (1) Adsorção. (2) Adesão. (3) Formação de microcolônias. (4) Maturação/formação da EPS. (5) Adesão de outros microrganismos e liberação de micro-colônias.

Fonte: Lucchesi (2006), adaptado de Colorado Boulder Applied Mathematical Biology Group, 2011.

A colonização da superfície depende diretamente das associações de espécies planctônicas, sendo que uma espécie pode ser a colonizadora primária, atraindo bactérias da mesma ou outras espécies, formando uma colônia heterogênea (LUCCHESI, 2006). Nesse contexto, a composição do biofilme depende, basicamente, das condições do ambiente: temperatura, composição do meio, pressão, pH, e disponibilidade de oxigênio dissolvido (O'TOOLE et al., 2000).

De acordo com Madigan et al. (2010), os biofilmes aprisionam os nutrientes necessários ao crescimento microbiano e ajudam a impedir o destacamento das células em superfícies presentes em sistemas de fluxo corrente. Assim, os biofilmes podem ser considerados comunidades microbianas funcionais e não apenas células fixadas em matriz aderente.

Segundo Caixeta (2008), a presença de poros no interior do biofilme tem várias funções, como o transporte facilitado com difusão passiva ou auxílio de água e o transporte de oxigênio no interior do biofilme. Entretanto, a limitação da difusão e o consumo de oxigênio resultam no baixo conteúdo de oxigênio no interior do biofilme,

mostrando a possibilidade de co-ocorrência de microrganismos aeróbios e anaeróbios no biofilme.

3.4 BIOFILMES INDUSTRIAIS

Quando os biofilmes são instalados nas indústrias, eles contribuem para contaminar áreas de processo, já que representam fontes de liberação e disseminação de microrganismos, causando prejuízos financeiros e retrabalho, que pode ser prevenido ou controlado (CAPELLETTI, 2006). Para Lucchesi (2006), o problema com biofilmes está presente em todo segmento industrial que tenha água em seu sistema, como as torres de resfriamento, sistemas de tratamento de água e em qualquer sistema que tenha outro tipo de fluido em circulação.

Enquanto os microrganismos se multiplicam em escala logarítmica nos fluidos de corte, restos metabólitos são liberados por esses microrganismos, o que resulta em problemas significativos com o fluido, além da perda de qualidade das peças de trabalho e, até mesmo, da ferramenta (CAPELLETTI, 2006; RABENSTEIN et al., 2009).

Para Runge e Duarte (1990) e Capelletti (2006), os biofilmes geralmente começam a se formar se a concentração dos microrganismos no fluido for superior a 10^4 Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL). Por outro lado, caso a concentração seja inferior a essa, é considerada satisfatória, pois não influencia significativamente as propriedades dos fluidos.

Os maiores problemas associados aos biofilmes são: maior resistência a agentes antimicrobianos, maior população, maior dificuldade de remoção, aumento de custo com a substituição, limpeza e manutenção de equipamentos e até efeitos deletérios na qualidade final do produto. Esses problemas são ligados à produção de EPS, estrutura unificadora e protetora dos biofilmes, que forma uma barreira e protege as células da colônia das medidas aplicadas para sua eliminação (CHRISTENSEN e CHARACKLIS, 1990; LUCCHESI, 2006).

Quando utilizado fluido de corte, é comum a contaminação por biofilmes, resultando em alterações físico-químicas na emulsão óleo/água, que pode levar uma empresa a descartar grandes quantidades de fluido, causando sérios problemas ambientais e elevado custo com a reposição desta emulsão (RUNGE e DUARTE, 1990).

Os problemas ocorrem devido ao fato de haver recirculação do fluido durante vários meses no interior da instalação industrial e a existência de locais que propiciam a deposição de materiais e resíduos, facilitando a formação de biofilmes (CAPELLETTI, 2006).

Nesse segmento, os problemas advindos da contaminação por biofilmes são principalmente as alterações nas propriedades originais do fluido (aumento da viscosidade, desestabilização da emulsão, perda da capacidade de lubrificação e refrigeração), deterioração de equipamentos e problemas relacionados à saúde dos trabalhadores. Assim, o período de utilização do fluido é reduzido e precisam ser tomadas providências quando o descarte é inevitável, como a contratação de empresas especializadas para o destino final (RUNGE e DUARTE, 1990).

Assim, estudo do crescimento microbiológico no fluido em uso é importante para proporcionar melhor compreensão dos microrganismos que nele proliferam, a fim de prevenir, controlar ou erradicar potenciais formadores de biofilme para otimizar o processo industrial (CAPELLETTI, 2006). Dessa forma, análises microbiológicas dos biofilmes no seguimento industrial são justificadas por possibilitarem intervenções que podem aumentar o tempo de vida útil do fluido e diminuir a velocidade de degradação do mesmo (GRUB, 2013).

3.5 BIOCIDAS E ÓLEOS ESSENCIAIS

No controle das contaminações por biofilmes em fluidos de corte podem ser utilizados antissépticos e antibióticos que atuam de formas diferentes, agindo sobre um

ou mais grupos de microrganismos (CAETANO et al., 2011). Segundo Millezi (2012), estratégias de controle de biofilmes são investigadas com intuito de retardar, reduzir ou eliminar a sua formação em equipamentos e utensílios. Assim, os óleos essenciais e seus compostos individuais têm sido pesquisados como novas ferramentas que podem ser aplicadas nas indústrias para controlar bactérias.

De acordo com Viana (2009), compostos denominados biocidas são substâncias químicas com atividade antimicrobiana que são amplamente usados em diversos setores industriais. Eles podem ser orgânicos ou inorgânicos e apresentam requisitos importantes para sua aplicação, como não ser corrosivo, possuir adequada biodegradabilidade e apresentar baixo custo.

Ainda segundo Viana (2009), os biocidas interferem significativamente no desenvolvimento do biofilme por possuírem atividade contra a estrutura e o metabolismo celular dos microrganismos. São substâncias isoladas ou combinadas, voltadas para a eliminação ou redução de microrganismos em sistemas industriais.

Alguns biocidas podem não afetar alguns tipos de microrganismos, porém, podem inibir outros. A efetividade está relacionada à sua composição química, concentração, tempo de exposição e, principalmente, à maneira pela qual essas substâncias agem sobre os microrganismos. A forma de ação se baseia na interação inicial do biocida com a parte alvo do microrganismo pelas afinidades químicas, principalmente pela parede celular, resultando em processos que comprometem ou destroem a célula bacteriana (VIANA, 2009).

Os fabricantes têm adicionado certas quantidades de biocidas aos fluidos de corte por conta da grande suscetibilidade do fluido à proliferação de microrganismos. Runge e Duarte (1990) afirmam que a quantidade de biocida adicionada ao fluido é limitada, além do custo, pela sua estabilidade e pelos efeitos nocivos que a concentração excessiva dos biocidas pode causar à saúde humana, como exemplo de doenças de pele e respiratórias.

Segundo Runge e Duarte (1990), a adição de biocida à emulsão pode ser feita antes da contaminação, já que a quantidade a ser adicionada para seu tratamento é muito maior que a de conservação. Além disso, grandes quantidades de biocidas nos

fluidos de corte resultam no enfraquecimento do material anticorrosivo e diminuição de pH a níveis indesejáveis.

Uma forma alternativa de controlar microrganismos é utilizando biocidas naturais (óleos essenciais), substâncias que possuem características antissépticas extraídas das plantas (TEIXEIRA, 2013). Millezi et al. (2012) afirmam que os óleos essenciais são metabólitos secundários vegetais com propriedades biológicas diferenciadas, como a atividade contra microrganismos. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) desses óleos para as bactérias devem ser determinadas e variam de acordo com o óleo utilizado, dos compostos majoritários e do tipo de bactéria.

Dentre as plantas e os condimentos já pesquisados e utilizados estão o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e o alfavacão, alfavaca ou alfava-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) (OLIVEIRA, 2011). O cravo-da-índia é uma especiaria com sabor marcante atribuído ao eugenol, que é o principal constituinte desse óleo (83,75%) e responsável pela ação antimicrobiana e antioxidante (SCHERER et al., 2009). A planta alfavaca é um subarbusto aromático de onde é extraído o óleo essencial, que também possui como principal constituinte de sua composição o eugenol (77,3%) (LORENZI e MATOS, 2002).

Ao aplicar o controle por óleos essenciais, decide-se por um tipo de controle que entra em acordo com as exigências atuais de redução de resíduos, além de não provocar a resistência bacteriana (VIANA, 2009; CAETANO et al., 2011). Os óleos essenciais com atividade antimicrobiana são inofensivos ao ambiente e às pessoas, sendo considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência a microrganismos patogênicos (VIANA, 2009). Assim, considerando que são extraídos de fontes naturais/renováveis, esses óleos tornam o controle de degradação por microrganismos mais sustentável e menos agressivo ao meio ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Câmpus Londrina e no Laboratório de Comando Numérico Computadorizado do Câmpus Cornélio Procópio.

Para o teste de formação de biofilme, foram utilizadas bactérias isoladas de amostras de fluido de corte provenientes de uma máquina de fresamento (Figura 2) instalada no Câmpus Cornélio Procópio e funcionando com fluido vegetal ou mineral.



Figura 2 – Máquina de fresamento. (a) Visão lateral do local de usinagem das peças. (b) Detalhe do reservatório onde se realizavam as coletas de amostra.

Fonte: Autoria Própria

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de fluido de corte vegetal e mineral foram coletadas com pipeta de 25 mL até completar o volume de 100 mL. O material foi transportado até o Câmpus Londrina em frasco de vidro esterilizado e acondicionado em caixa térmica com temperatura entre 4 e 10°C, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Do total de colônias de bactérias isoladas, foram selecionadas 10% das colônias isoladas do fluido vegetal e 10% do fluido mineral, escolhidas aleatoriamente, procurando selecionar bactérias crescidas no início, meio e fim do tempo de uso.

Para isolar as colônias de bactérias presentes no fluido de corte, utilizou-se amostras de fluido vegetal e amostras de fluido mineral, que permaneceram na máquina por três meses de trabalho com cada fluido.

4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A Figura 3 apresenta a sequência de procedimentos microbiológicos que foram realizados com as amostras coletadas na máquina de fresamento.

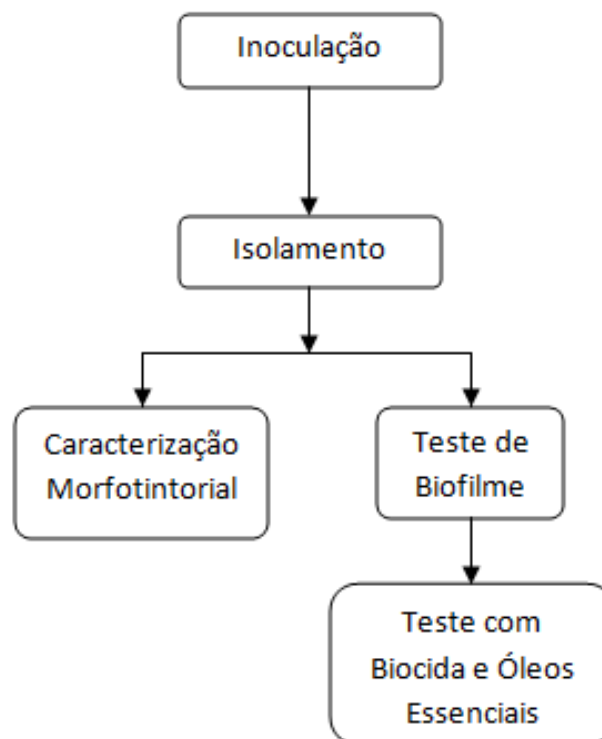


Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos microbiológicos.
Fonte: Autoria Própria

4.2.1 Inoculação

Para promover o crescimento das bactérias presentes no fluido de corte, realizou-se inoculação por meio da técnica de espalhamento de alíquotas de 0,1 mL das amostras em placas de Petri contendo meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA). Esse procedimento foi realizado em triplicata, para permitir repetição dos resultados, como indica a Figura 4, reservando placas sem inóculo (controle), para confirmar a esterilidade do meio de cultura utilizado.

As placas inoculadas foram incubadas em estufa da marca Fanem modelo 502, a temperatura de $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 24h.

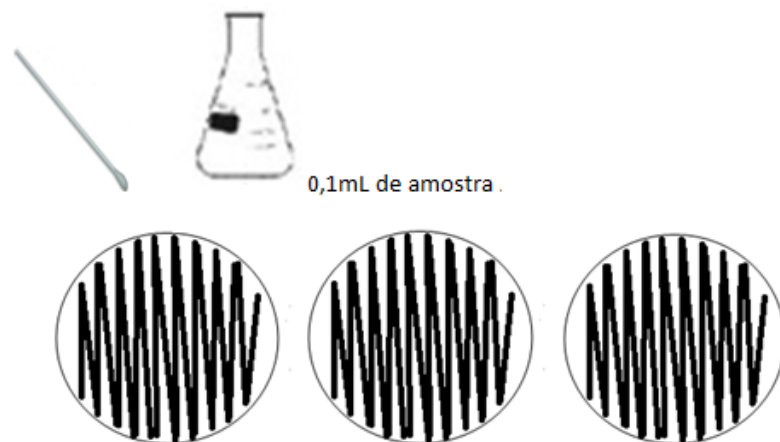


Figura 4 – Processo de inoculação de amostras em placas de Petri.
Fonte: Autoria Própria

4.2.2 Isolamento Bacteriano

Para o isolamento das bactérias em colônias puras, usou-se o método de esgotamento segundo Okura et al. (2008), em que uma alça de inoculação estéril era inserida na cultura e, posteriormente, semeada em uma nova placa contendo meio nutriente sólido PCA. Na sequência, a cultura era espalhada sobre a superfície do meio

sólido de modo a se obter, progressivamente, quantidades menores do material, como mostrado na Figura 5. Ao final, cada colônia devidamente isolada era transferida, com alça de inoculação, para um tubo de ensaio contendo 6 mL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI).

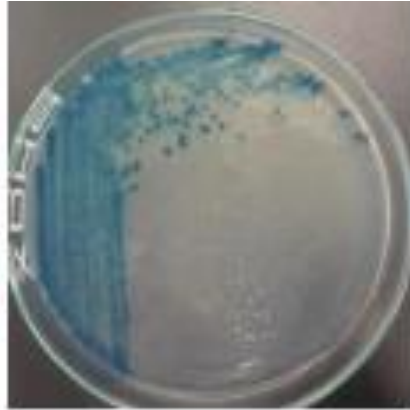


Figura 5- Técnica de esgotamento – direção da semeadura por esgotamento. Fonte: Autoria Própria

4.2.3 Caracterização Morfotintorial dos Isolados Bacterianos

Para observação da morfologia dos isolados, realizou-se exame microscópico das células pela metodologia do teste morfotintorial de Gram baseado em Monteiro et al. (2010), com microscópio biológico binocular da marca Opton. O método consistiu em flambar uma lâmina limpa em bico de Bunsen e após fria, adicionou-se uma gota de água estéril ao centro, com um alça de inoculação estéril coletou-se a colônia desejada e esfregou-se na gota de água com movimentos circulares. Após ter evaporado a água, a lâmina foi passada três vezes pelo bico de Bunsen e coberta com cristal violeta por 1 minuto, seguida de lavagem com água destilada. Então a lâmina foi lavada com lugol mordente por 1 minuto e novamente lavada com água destilada. Em seguida se aplicou solução decolorante por 15 segundos, com a lâmina inclinada e lavada com água destilada, para então aplicar a fucsina por 30 segundos e lavar com água destilada.

Os reagentes envolvidos têm as seguintes funções (OKURA et al., 2008):

- Cristal violeta e lugol formam um complexo insolúvel;
- Solução descorante funciona como solvente de lipídios e desidratante de proteínas;
- Fucsina funciona como corante básico de contraste.

As bactérias que preservam a coloração roxa do primeiro corante designam-se Gram positivas, enquanto as bactérias que, após a lavagem com solução descorante foram incapazes de reter o corante, foram designadas Gram negativas, coradas pela fucsina.

4.2.4 Teste de Formação de Biofilme

Esse teste foi realizado para avaliar a capacidade de bactérias escolhidas ao acaso formar biofilme a partir das amostras de fluidos de cortes, como a partir das associações entre as mesmas e para avaliar a capacidade de redução da formação de biofilme após aplicação do biocida e óleos essenciais.

O teste consistiu em duas fases:

- Primeira fase: Avaliou a formação de biofilme a partir dos isolados de bactérias selecionados e suas associações para os dois tipos de fluido de corte (vegetal e mineral).
- Segunda fase: Avaliou a influência da adição de biocida e óleos essenciais na formação de biofilme dos mesmos isolados e suas associações nos dois tipos de fluidos de corte.

Para a realização do teste, foi preciso preparar uma suspensão bacteriana tendo como padrão a escala McFarland nº0,5. No preparo da suspensão foram inseridas alçadas com bactérias em tubos contendo solução salina até que a turbidez fosse equivalente a da escala nº 0,5, correspondente a $1,8 \times 10^8$ UFC/mL, como mostra a Figura 6.

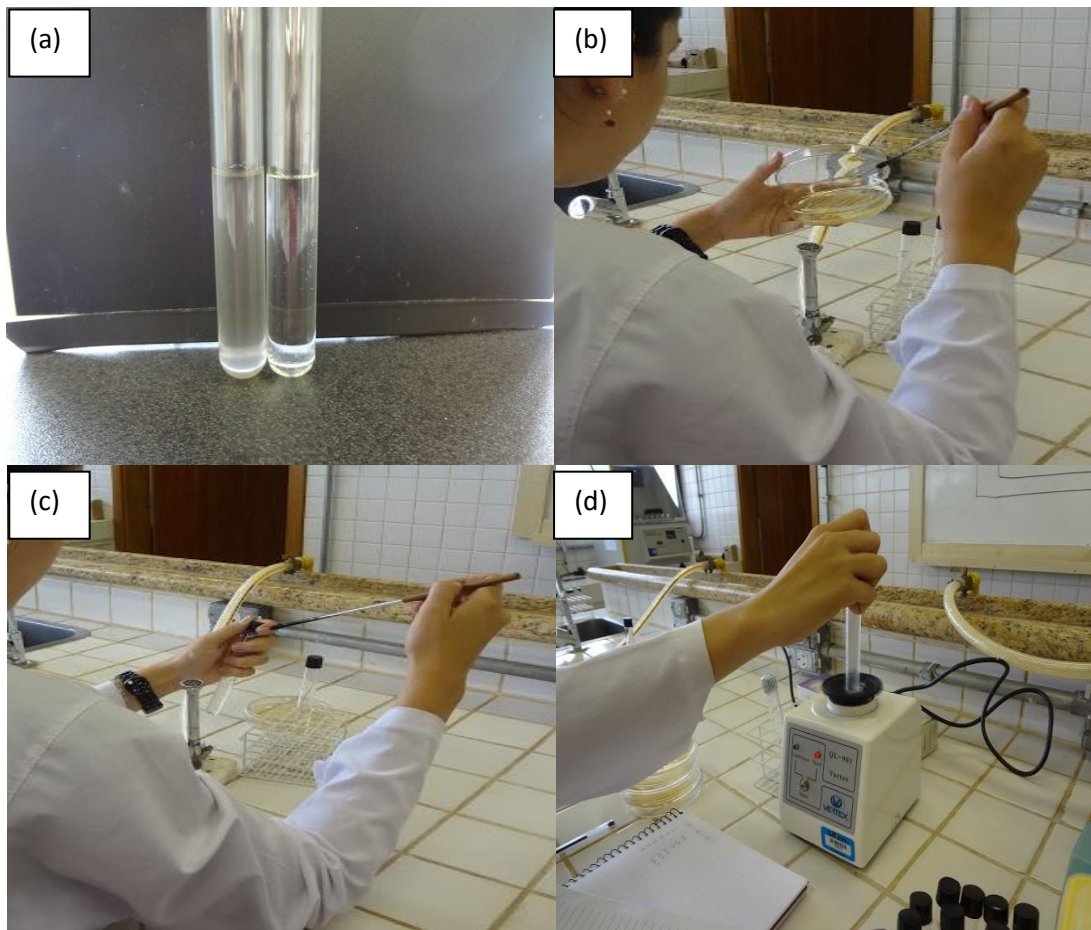


Figura 6 – Preparo da suspensão bacteriana pela escala McFarland. (a) Primeiro tubo contendo solução McFarland escala nº0,5 e segundo tubo com solução salina. (b) Alçadas na colônia de bactérias. (c) Inserção no tubo contendo solução salina. (d) Homogeneização da mistura e repetição do processo até que a turbidez fosse equivalente a do tubo contendo a escala McFarland.

Fonte: Autoria Própria.

Para as associações de bactérias, foi feita a padronização na escala McFarland nº0,5 para cada uma das bactérias em questão, e em seguida, retirou-se 1 mL de cada uma delas e as transferiu para um tubo de tampa rosqueável esterilizado, para permitir homogeneização da amostra.

Na primeira fase, o teste de formação de biofilme em placas com poços U foi realizado conforme Stepanovic (2000), com modificações, em que 50µL da solução McFarland nº0,5 das bactérias e de suas associações foi transferido para cada um dos

poços da placa de poliestireno contendo 150µL de caldo BHI (Figura 7), sendo incubada a 35±1°C durante 24h.

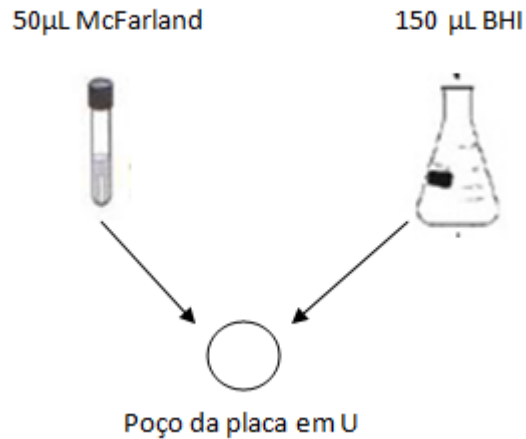


Figura 7 – Preenchimento dos poços da placa utilizando a suspensão bacteriana.
Fonte: Autoria Própria

As bactérias foram nomeadas de A até L, sendo de A a F bactérias isoladas de fluido mineral e de G a L bactérias isoladas de fluido vegetal. As bactérias isoladas e suas associações foram distribuídas em triplicata na placa com poços U, conforme indica o modelo apresentado na Figura 8 e na Figura 9, que mostra a placa com poços U completa, sendo que os poços brancos contiveram apenas o meio BHI sem adição de bactérias ou inibidores.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D
B	E	E	E	F	F	F	G	G	G	H	H	H
C	I	I	I	J	J	J	K	K	K	L	L	L
D	AB	AB	AB	BC	BC	BC	CD	CD	CD	DE	DE	DE
E	EF	EF	EF	FA	FA	FA	GH	GH	GH	HI	HI	HI
F	IJ	IJ	IJ	JK	JK	JK	KL	KL	KL	LG	LG	LG
G	ABC	ABC	ABC	CDE	CDE	CDE	DEF	DEF	DEF	GHI	GHI	GHI
H	HIJ	HIJ	HIJ	JKL	JKL	JKL				branco	branco	branco

Figura 8 – Distribuição das bactérias e suas associações nos poços da placa.
Fonte: Autoria Própria

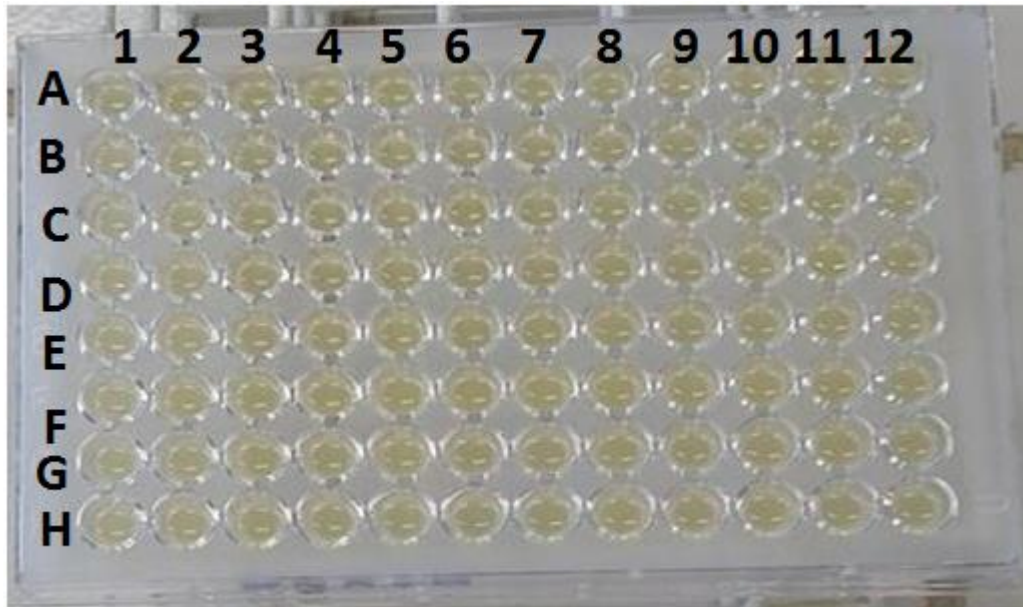


Figura 9- Placa com poços U preenchidos com meio BHI e solução McFarland nº0,5 das bactérias e de suas associações.
Fonte: Aatoria Própria.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado com solução salina esterilizada, sendo incubados a 35 ± 1 °C durante 1 hora e 30 minutos para fixação celular e, em seguida, foram coradas com cristal violeta por 15 minutos, como indica a Figura 10.

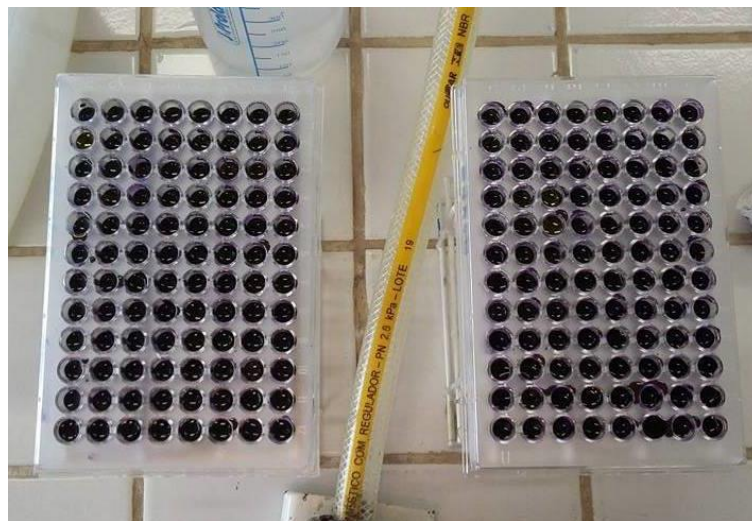


Figura 10 – Placas com poços U preenchidos com cristal violeta.
Fonte: Aatoria Própria.

O excesso do corante foi retirado e novamente os poços foram lavados com solução salina esterilizada, sendo então submetidos à secagem a 35 ± 1 °C por 30 minutos. A formação de biofilme foi determinada por meio da leitura da densidade óptica a 450nm em um aparelho ELISA da marca Thermo Plate, como mostrado na Figura 11.



Figura 11 – Leitura da placa de poços U em aparelho ELISA.
Fonte: Aatoria Própria

As amostras foram classificadas segundo Stepanovic (2000) de acordo com o cut-off (DO_C) definido a partir da média dos três poços brancos. Para classificar as colônias analisadas (DO_A) quanto à capacidade e intensidade da formação de biofilme nos poços usou-se a seguinte relação:

- $DO_A \leq DO_C$, não formadora de biofilme (NF)
- $DO_C < DO_A \leq 2*DO_C$, fracamente formadora de biofilme (FRF)
- $2*DO_C < DO_A \leq 4*DO_C$, moderadamente formadora de biofilme (MF)
- $4*DO_C < DO_A$, fortemente formadora de biofilme (FF).

Nessa etapa, encontraram-se os valores referentes ao crescimento normal do biofilme (CN), sem interferência de nenhum agente inibidor.

Já na segunda fase, foi acrescido ao meio BHI os óleos essenciais de cravo-da-índia (CRA) e alfavaca (ALF) e o biocida sintético Ricol (BIO), com o intuito de verificar a redução na formação de biofilme. Um teste com água (AG) foi realizado da mesma maneira para verificar que a redução da formação é dada pelo agente inibidor e não pela água usada para diluição.

Para esse teste, utilizou-se a melhor concentração encontrada por Pinto (2015), para inibição do crescimento das bactérias, que nesse caso foi 1% para os óleos e biocida. Os óleos essenciais foram diluídos em água, conforme especificação do fabricante, de modo que quando fosse acrescido ao meio de cultura BHI, chegasse à concentração de 1%. Uma concentração de 150µL do meio de cultura BHI com óleos essenciais ou biocida foi colocada nos poços das placas juntamente com 50µL das soluções McFarland das bactérias e das associações, sendo incubada a 35±1°C durante 24h.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado com solução salina esterilizada, sendo incubados a 35±1°C durante 1 hora e 30 minutos para fixação celular e, em seguida, foram coradas com cristal violeta por 15 minutos.

O excesso do corante foi retirado e novamente os poços foram lavados com solução salina esterilizada, sendo então submetidos à secagem a 35±1°C por 30 minutos. A formação de biofilme foi determinada por meio da leitura da densidade óptica a 450nm em um aparelho ELISA da marca Thermo Plate. Em relação à capacidade de formação de biofilme das bactérias e associações, a classificação ocorreu de acordo com o cut-off, da mesma forma que na fase anterior.

A partir das análises anteriores, foi possível comparar o comportamento das bactérias individuais e associadas para cada tipo de inibidor utilizado, sendo possível

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* R (R Development Core Team, 2011), versão 3.2.0, juntamente com o pacote ExpDes (Ferreira et al., 2013).

O modelo estatístico utilizado para fazer a análise dos valores resultantes dos quatro ensaios, foi delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 16x4. O modelo estatístico considerou o efeito da interação entre os fatores Bactérias e Inibidores além do efeito do fator Bactérias (em dezesseis níveis) e do fator Inibidores (em quatro níveis).

Dessa forma, o modelo estatístico multiplicativo é fornecido pela Equação 1:

Em que:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{Equação 1}).$$

- Y_{ijk} = observação correspondente à k -ésima unidade experimental submetida ao i -ésimo nível do fator Bactérias e j -ésimo nível do fator Inibidores;
- μ = média global comum a todas as observações;
- α_i = efeito do i -ésimo nível do fator Bactérias;
- β_j = efeito do j -ésimo nível do fator Inibidores;
- $\alpha\beta_{ij}$ = efeito de interação entre o i -ésimo nível do fator Bactérias e o j -ésimo nível do fator Inibidores;
- e_{ijk} = componente do erro aleatório associado à observação Y_{ijk} .

O modelo está sujeito às seguintes restrições:

$$\sum_{i=1}^4 \alpha_i = 0 \quad \sum_{j=1}^3 \beta_j = 0 \quad \sum_{i=1}^4 \alpha\beta_{ij} = 0 \quad \sum_{j=1}^3 \alpha\beta_{ij} = 0$$

Sobre as restrições, considerou-se que:

- $i = 1, 2, 3, 4, \dots, 16$ (número de níveis de α : bactérias);
- $j = 1, 2, 3, 4$ (número de níveis de β : inibidores);
- $k = 1, 2, 3$ (número de repetições);

Para a realização da análise de variância e comparação das médias da variável, considerou-se um nível de significância de 5%.

Primeiramente foi analisado se a interação entre os fatores Bactérias e Inibidores é significativa. Esta análise foi feita por meio do Valor-P. Se o Valor-P for menor que 0,05 (5% de significância), a interação entre os dois fatores é significativa.

Já as comparações de médias são realizadas fixando-se um fator e comparando as médias dentro do outro fator, e vice-versa, que são chamados de desdobramentos. As comparações de médias foram realizadas segundo o teste de Tukey, que compara a diferença entre duas médias (contraste) com a diferença mínima significativa (Δ), apresentada na Equação 2. Duas médias são consideradas diferentes quando o contraste é maior ou igual a Δ .

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QM_{res}}{r}} \quad (\text{Equação 2}).$$

Em que:

- q : é a amplitude total estudentizada (tabelado);
- QM_{res} : é o quadrado médio do resíduo;
- r : representa o número de repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos obtidos dos fluidos de corte mineral e vegetal foram predominantemente bacilos e estafilococos (Figura 12).

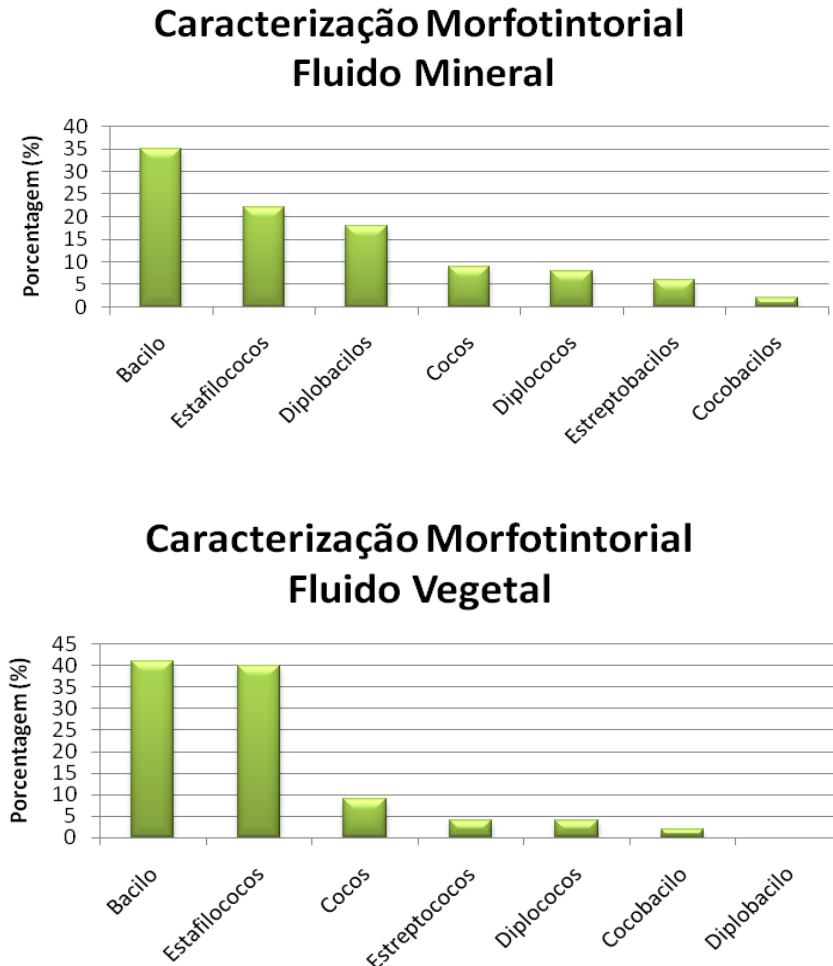


Figura 12 – Caracterização morfológica das bactérias presentes em fluido de corte mineral e vegetal.

Fonte: Autoria Própria.

Para as bactérias isoladas do fluido mineral, observou-se em relação ao teste morfotintorial de Gram, 55% das bactérias classificadas como Gram-positivas e 45% Gram-negativas. Para o fluido de origem vegetal obteve-se 65% Gram-positivas e 35% Gram-negativas, que são as mais ameaçadoras, haja visto que têm maior virulência e são mais resistentes aos antibióticos.

Para as bactérias escolhidas aleatoriamente para desenvolver o teste de formação de biofilme, também houve predomínio de Gram-positivas, bacilos e estafilococos. As características dessas bactérias estão descritas na Tabela 1, com resultado expresso em porcentagem.

Tabela 1 – Resultado de teste morfotintorial das bactérias selecionadas para teste de formação de biofilme, expresso em porcentagem.

COLORAÇÃO DE GRAM + FORMA E ARRANJO			
FLUIDO DE CORTE VEGETAL		FLUIDO DE CORTE MINERAL	
ESTAFILOCOCOS POSITIVO	67%	BACILO NEGATIVO	16,5%
BACILOS NEGATIVO	33%	ESTAFILOCOCOS POSITIVO	34%
		COCOS POSITIVO	16,5%
		DIPLOCOCOS NEGATIVO	16,5%
		DIPLOBACILO POSITIVO	16,5%

Fonte: Aatoria Própria.

Os resultados deste estudo vão contra os observados por Veillette et al. (2001) e Thomé et al. (2007), que afirmam que os fluidos propiciam principalmente o crescimento de bactérias Gram-negativas, e Christensen e Characklis (1990) se referem às Gram-negativas como prováveis causadores de problemas microbiológicos, principalmente na formação de biofilmes. A minoria de bactérias Gram-negativas neste estudo pode ser explicada pelo fato da máquina estar localizada em local isolado, com pouco contato humano, evitando assim, contaminação por bactérias patogênicas (gram-negativas).

Almeida et al. (2011) destacam, entre as bactérias, bacilos e estafilococos como os mais comuns nos fluidos de corte, e afirma que eles precisam ser evitados pelos problemas que podem gerar na falta de controle e cuidado, como perda da qualidade do fluido e doenças de pele nos operadores.

Segundo McBain et al. (2003), a maior parte dos estudos descrevem as bactérias Gram-negativas como as principais formadoras de biofilme, porém as bactérias Gram-positivas também são presentes, tendo menor capacidade de fixação a superfícies que bactérias Gram-negativas.

A Figura 13 apresenta dois exemplos de bactérias isoladas e resultados para teste morfotintorial de Gram.

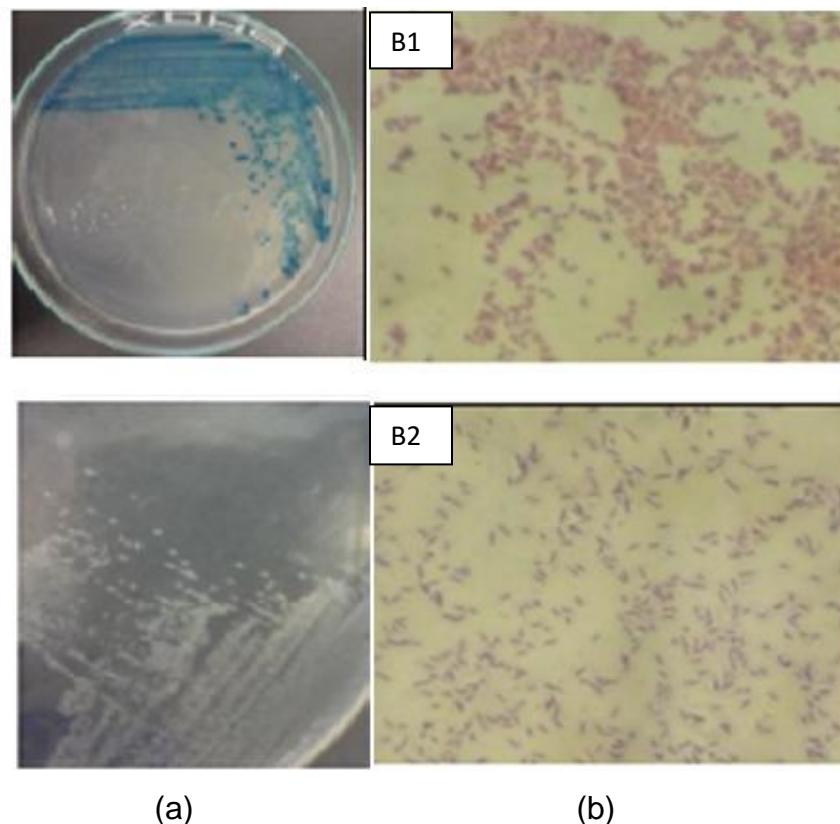


Figura 13 – (a) Isolamento de bactérias. (b) Resultado de teste morfotintorial de Gram. (B1) Resultado de Gram Negativo. (B2) Resultado de Gram Positivo. Fonte: Autoria Própria.

5.2 TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

O resultado do teste de formação de biofilme foi dado a partir da comparação do grau da formação de biofilme antes e após a aplicação dos inibidores (biocida sintético comercial, óleo essencial de alfavaca e óleo essencial de cravo). A água aparece nos resultados para mostrar que a inibição se dá pelo óleo e não pela água, já que, conforme indicação, o óleo essencial deve ser diluído antes do uso. A formação de biofilme nos diferentes tratamentos está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise do crescimento das bactérias individuais e em associações de duas ou três bactérias. As colunas representam os diferentes tratamentos (CN: crescimento normal; BIO: biocida; CRA: óleo essencial de cravo; ALF: óleo essencial de alfavaca; AG: água) e as linhas são as respostas quanto à formação de biofilme (NF: não formadora; FRF: fracamente formadora; MF: moderadamente formadora; FF: fortemente formadora), em porcentagem (%).

	MINERAL					VEGETAL				
	INDIVIDUAIS					INDIVIDUAIS				
	CN	BIO	CRA	ALF	AG	CN	BIO	CRA	ALF	AG
NF	17%	100%	100%	50%	0%	0%	83%	0%	0%	50%
FRF	67%	0%	0%	50%	33%	100%	17%	100%	100%	50%
MF	17%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
FF	0%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
	DUPLAS					DUPLAS				
	CN	BIO	CRA	ALF	AG	CN	BIO	CRA	ALF	AG
	NF	0%	100%	100%	33%	0%	0%	83%	0%	0%
FRF	67%	0%	0%	67%	67%	100%	17%	100%	100%	100%
MF	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
FF	0%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
	TRIOS					TRIOS				
	CN	BIO	CRA	ALF	AG	CN	BIO	CRA	ALF	AG
	NF	0%	100%	100%	33%	33%	0%	100%	67%	33%
FRF	67%	0%	0%	67%	33%	100%	0%	33%	67%	33%
MF	33%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
FF	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Fonte: Autoria Própria.

É possível observar que as associações não tiveram grandes interferências observáveis no desenvolvimento do biofilme ou na inibição da formação do mesmo, o que não convém com o que diz Simões et al. (2009), que relatam maior formação e resistência dos biofilmes multiespécie quando comparado com monoespécie. A indiferença das associações foi explicada por Thomé et al. (2007), que afirmaram que as bactérias podem competir pelo mesmo substrato e, por isso, o desenvolvimento de alguma delas leva à inibição do crescimento de outras.

No estudo com fluido mineral, a formação do biofilme no crescimento normal foi um pouco maior quando em associações, com 33% de moderadas formadoras enquanto nas individuais esse valor é de 17%.

Passman (1997) afirma que o fluido de corte tem grande quantidade de nutrientes que facilitam o desenvolvimento microbiano e que os óleos de origem mineral possuem glicose, ácido graxo, aminas e mais outros constituintes que contém os nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos.

Tanto as bactérias individuais quanto as associações tiveram o tratamento com biocida sintético e com óleo essencial de cravo como os mais eficientes (100% NF) no fluido mineral, não possibilitando a formação de biofilme, indicando que ambos inativaram o crescimento das bactérias desse fluido nas placas com poços U.

O óleo essencial de alfavaca, quando comparado com o crescimento normal, acabou com as moderadas e reduziu ou manteve igual o número de fracamente formadoras, passando de 67% FRF e 33% MF em duplas e trios para 67% FRF e 33% NF após o tratamento com o óleo e quando individuais passaram de 17% NF, 67% FRF e 17% MF para 50% NF e 50%FRF. Dessa forma, se mostrou eficiente, tanto para isolados individuais quanto para associações, mas não tanto quanto o biocida sintético e o óleo essencial de cravo para tratamento de biofilmes em fluido mineral.

A partir do momento que houve adição de água ao meio, o desenvolvimento do biofilme foi mais diversificado no fluido mineral, tendo-se fortemente formadoras de biofilmes (33% FF quando individuais e em duplas e 0% em trios), já que a água propicia um ambiente favorável para o crescimento e reprodução das bactérias.

Almeida et al. (2011) afirmam que os fluidos a base de óleo vegetal estão sendo cada vez mais utilizados por serem menos poluentes ao ambiente e causarem menos

agressão ao operador, porém eles são facilmente contaminados por microrganismos por possuírem nutrientes que facilitam sua reprodução.

No fluido vegetal, a formação de biofilme teve comportamento semelhante tanto para as bactérias individuais quanto para as associações, sendo em 100% dos casos, fracamente formadoras.

O biocida sintético se mostrou novamente um tratamento eficiente na redução da formação de biofilme, tendo o mesmo resultado para bactérias individuais e associações em duplas, em que quando comparadas com o crescimento normal, 83% foram não formadoras de biofilme e 17% permaneceram como fracamente formadoras e, quando em trios, a totalidade passou a ser não formadora.

O biocida sintético foi o mais eficiente na redução da formação de biofilme para os dois fluidos, porém, observou-se melhor resultado para o fluido de origem mineral, que mesmo possuindo bactérias moderadamente formadoras de biofilme no crescimento normal, passaram a ser não formadoras após o tratamento com biocida.

Thomé et al. (2007) constataram em seu estudo que o tratamento com biocida em fluido de corte teve resultados imediatos e que após cinco minutos da adição ao fluido de corte não se constatou mais bactérias. Constataram também que o tratamento com biocidas diminui a viabilidade das bactérias no fluido, mas que com o tempo as mesmas espécies voltaram a povoá-lo, mostrando que a eficácia do tratamento é reduzida conforme o tempo passa.

O óleo essencial de cravo no fluido vegetal se comportou da mesma maneira para isolados individuais e associações em duplas, permanecendo o mesmo resultado que o ocorrido para o crescimento normal, não mostrando eficiência no tratamento. Para associações em trios, o tratamento com esse óleo essencial foi eficiente e 67% das associações foram consideradas não formadoras de biofilme. Rabêlo (2010), Santos et al. (2011) e Almeida et al. (2014) testaram o óleo essencial de cravo como agente antibacteriano e obtiveram resultados positivos.

O óleo essencial de alfavaca no fluido vegetal teve comportamento semelhante ao do crescimento normal para bactérias individuais e em duplas, mas em trios, 33% passaram a ser consideradas não formadoras de biofilme. Castro et al. (2013) testaram a eficiência do óleo essencial de alfavaca em bactérias Gram-negativas e Gram-

positivas e obtiveram resultados satisfatórios e Almeida et al. (2014) também obtiveram bons resultados quando testaram esse óleo como agente antibacteriano.

A presença da água no fluido vegetal teve comportamento diferente do ocorrido para o fluido mineral. Nesse fluido, ao invés de aumentar a formação do biofilme, a água contribuiu na inibição da formação para bactérias individuais e em trios e teve comportamento igual ao do crescimento normal para as duplas.

Percebeu-se que quando não foi adicionado nenhum tratamento antibacteriano, o fluido mineral foi mais suscetível à formação de biofilme, com presença de moderadas formadoras, o que não existiu no fluido de origem vegetal.

Millezi et al. (2012) afirmam que uma abordagem diferente para o tratamento pode ser o uso dos óleos essenciais, sendo que vários já foram descritos como potenciais agentes antibacterianos e contra biofilmes.

Capelletti (2006) afirma que as bactérias Gram-negativas têm membrana externa da parede celular composta por elevado conteúdo de lipídeos e lipoproteínas, além da presença de espaço periplasmático, aspectos considerados importantes na resistência à penetração das substâncias ativas dos biocidas, e que as Gram-positivas têm menor capacidade de adaptação e mutação. Nesse estudo encontrou-se maior quantidade de bactérias Gram-positivas, que são menos resistentes quando comparadas às Gram-negativas.

Segundo Capelletti (2006), a capacidade de penetração no biofilme (que é maior quanto menor é a massa molar) e a capacidade de atravessar a membrana celular são aspectos que interferem na atuação do biocida. Porém, pela grande variedade de bactérias existentes em um único fluido de corte, Piubeli et al. (2003) afirmam que o uso de apenas um tipo de biocida pode controlar o crescimento de algumas espécies e permitir o desenvolvimento de outras.

Compostos fenólicos, como o eugenol, composto principal dos óleos essenciais de alfavaca e cravo, podem causar a interrupção da produção de energia devido à inibição da enzima pela oxidação de produtos ou através de outras interações não específicas com proteínas (MASON; WASSERMAN, 2002 apud MILLEZI, 2012). Dessa forma, justifica-se a eficiência desses óleos essenciais na redução da formação do biofilme nos fluidos analisados.

A não remoção completa dos biofilmes pode estar relacionada à concentração inibitória utilizada, que foi a mesma utilizada para as células planctônicas, já que segundo Ceri et al. (1999), quando se trata de células sésseis, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) encontrada para células planctônicas não deve ser considerada a mesma, pois ensaios de susceptibilidade a biocidas realizados em biofilmes mostram que a concentração do agente para erradicar o biofilme é de 100 a 1000 vezes maior que para células livres. Essa resistência dos biofilmes aos agentes inibidores é dada principalmente pela presença da EPS (Christensen e Characklis, 1990).

Como o comportamento do óleo essencial de cravo foi muito parecido com o comportamento do biocida sintético Ricol, para o teste estatístico de efeito dos tratamentos sobre a formação do biofilme se considerou apenas o crescimento normal, o crescimento com biocida, com óleo essencial de alfavaca e com água.

5.2.1 Análise Estatística da Formação de Biofilme em Fluido Mineral

Os valores de grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM), F calculado e valor-P para as bactérias, inibidores, interação entre bactérias e inibidores e resíduo do fluido mineral estão dispostos na Tabela 3. Os dados alcançaram a normalidade para realização dos testes

Tabela 3 - Resultados obtidos com a análise de variância para a formação de biofilme no fluido mineral.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F _c	Valor-P
Bactérias	15	5,75	0,38	24,55	<0,01
Inibidores	3	59,81	19,94	1277,75	<0,01
Bactérias x Inibidores	45	8,80	0,19	12,53	<0,01
Resíduo	128	1,99	0,016		
Total	191	76,35			

Fonte: Autoria Própria.

Como o valor-P da interação entre bactérias e inibidores é menor que 0,05, pode-se considerar significativa a interação entre eles, o que significa que o efeito do

tipo de associações entre bactérias sobre a formação dos biofilmes depende de qual inibidor seja considerado. Além disso, percebeu-se através dos valores de F calculados, maior efeito dos inibidores (1277,75) do que do tipo de associações de bactérias (24,55).

Para análise dos resultados estatísticos seguindo o teste de Tukey, os valores das médias estão descritos na Tabela 4. As letras maiúsculas correspondem ao comportamento de cada bactéria ou associação nos diferentes tratamentos, enquanto as letras minúsculas representam a interferência do tratamento nas bactérias/associações. Letras iguais correspondem a médias iguais ao nível de 5% de significância.

Tabela 4 – Análise de significância dos inibidores nas bactérias e das bactérias nos inibidores em fluido mineral.

BACTÉRIAS	CRESC. NORMAL	BIOCIDA	ALFAVA	ÁGUA
A	0.24 cdeA	0.111 abB	0.676 abC	0.164 efD
B	0.34 abcA	0.125 abB	0.638 abC	0.185 defD
C	0.19 eA	0.139 abB	0.662 abC	0.259 cdD
D	0.49 aA	0.140 abB	0.727 abC	0.583 aCD
E	0.302 bcdA	0.117 abB	0.667 abC	0.450 abD
F	0.29 bcdA	0.115 abB	0.804 abC	0.224 deD
AB	0.33 bcA	0.094 bB	0.725 abC	0.157 efgD
BC	0.279 cdeA	0.105 bB	0.749 abC	0.170 efD
CD	0.415 abA	0.122 abB	0.871 aC	0.478 abA
DE	0.412 abA	0.122 abB	0.706 abC	0.554 aC
EF	0.315 bcA	0.111 abB	0.579 bC	0.269 cdA
FA	0.304 bcA	0.109 abB	0.602 bC	0.201 deD
ABC	0.318 bcA	0.145 abB	0.773 abC	0.132 fgB
CDE	0.419 abA	0.134 abC	0.628 abB	0.486 abAB
DEF	0.349 abcA	0.140 abB	0.750 abC	0.344 bcA
BRANCO	0.204 deA	0.166 aA	0.672 abB	0.106 gB

Fonte: Autoria Própria.

Nota: Letras iguais correspondem a médias iguais.

Quanto ao resultado dos inibidores nos níveis das bactérias (análise em linha), todas as bactérias individuais se comportaram de maneira diferente para cada tratamento utilizado.

De acordo com a Tabela 4, metade das duplas teve comportamento diferente de acordo com o tratamento utilizado, 35% teve comportamento semelhante para o crescimento normal e com água e 15% foi semelhante para o óleo essencial de alfavaca e água.

Cada uma das associações em trios se comportou de maneira diferente com os inibidores. Uma teve comportamento igual para o biocida e água, outra teve o comportamento da água semelhante ao do crescimento normal e alfavaca, sendo os dois últimos diferentes entre eles, a última mostrou comportamento igual para o crescimento normal e o biocida.

No crescimento normal e com água, as bactérias individuais se comportaram de maneira diferente, não havendo um padrão de crescimento, seguindo médias estatisticamente diferentes dentro do mesmo tratamento. Com biocida e óleo essencial de alfavaca, a média do crescimento das bactérias individuais pode ser considerada igual, mantendo um padrão de crescimento para o mesmo tratamento.

Com biocida e óleo essencial de alfavaca, o crescimento de bactérias em associações de duplas foi mais homogêneo quando comparado com o crescimento normal e com água. Para o crescimento normal, com biocida e óleo essencial de alfavaca, não houve variação no crescimento das bactérias em associações de trios, havendo variação nesse tipo de associação apenas quando tratado com água.

A média dos poços em branco para crescimento normal teve comportamento semelhante à de uma bactéria individual e de uma associação de dupla. Para o biocida, o valor de branco é diferente de apenas uma associação de duplas, sendo igual ao restante. No óleo essencial de alfavaca o valor da média dos poços em branco teve comportamento estatisticamente igual ao das outras bactérias, o que explica todas as bactérias terem sido tidas como fracas ou não formadoras de biofilme como demonstrado na Tabela 2. Com a água, a média dos poços em branco teve crescimento igual ao de uma associação de duas e outra de três bactérias, sendo diferente das outras.

Percebeu-se que quando avaliado o comportamento das bactérias e suas associações no tratamento com água, este foi muito mais variado que quando tratado com outros agentes, mostrando que cada bactéria interage de maneira diferente na presença da água, podendo ser agente inibidor ou facilitador do crescimento de um biofilme. Com base em estudos publicados a este respeito, Capelletti (2006) afirma que quando o inóculo é diluído, seu comportamento pode variar de acordo com as condições do meio em que a célula se encontra e que podem ocorrer alterações comportamentais atípicas.

5.2.2 Análise Estatística da Formação de Biofilme em Fluido Vegetal

Para o fluido de origem vegetal os valores de graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM), F calculado (F_c) e valor-P para as bactérias, inibidores, interação de bactérias e inibidores e resíduo estão dispostos na Tabela 5. Os dados alcançaram a normalidade para realização dos testes.

Tabela 5 - Resultados obtidos com a análise de variância para a formação de biofilme no fluido vegetal.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F_c	Valor-P
Bactérias	15	6,79	0,45	3,03	<0,01
Inibidores	3	240,06	80,02	534,97	<0,01
Bactérias x Inibidores	45	13,77	0,31	2,05	<0,01
Resíduo	128	19,15	0,15		
Total	191	279,77			

Fonte: Autoria Própria.

Como o valor-P da interação entre bactérias e inibidores é menor que 0,05, pode-se considerar significativa a interação entre eles, indicando que o efeito do tipo de associação entre bactérias sobre a formação dos biofilmes depende de qual inibidor seja considerado.

Os resultados estatísticos seguindo o teste de Tukey estão descritos na Tabela 6. As letras maiúsculas devem ser avaliadas nas linhas e correspondem ao

comportamento de cada bactéria no tratamento aplicado, enquanto as letras minúsculas devem ser observadas em colunas e representam a interferência dos tratamentos nas bactérias. Letras iguais correspondem a médias iguais.

Tabela 6 - Análise de significância dos inibidores nas bactérias e das bactérias nos inibidores em fluido vegetal.

BACTÉRIAS	CRESC. NORMAL	BIOCIDA	ALFAVACA	ÁGUA
G	0.198 abB	0.175 abBC	0.773 aA	0.133 bcdC
H	0.250 abB	0.148 abC	0.723 aA	0.179abcdBC
I	0.286 abA	0.161 abB	0.694 aC	0.165 abcdB
J	0.274 abB	0.153 abC	0.671 aA	0.221 aBC
K	0.262 abA	0.146 abB	0.765 aC	0.128 cdB
L	0.222 abA	0.145 abB	0.776 aC	0.120 dB
GH	0.305 aA	0.152 abB	0.718 aC	0.201 abB
HI	0.278 abB	0.160 abC	0.675 aA	0.189 abcBC
IJ	0.229 abB	0.146 abC	0.747 aA	0.161abcdBC
JK	0.194 abB	0.133 abC	0.844 aA	0.156abcdBC
KL	0.189 abA	0.161 abA	0.692 aB	0.165 abcdA
LG	0.234 abA	0.208 aA	0.627 aB	0.208 aA
GHI	0.279 abA	0.118 bB	0.798 aC	0.124 cdB
IJK	0.244 abA	0.116 bB	0.655 aC	0.167 abcdD
JKL	0.218 abA	0.140 abB	0.548 aC	0.138 abcdB
BRANCO	0.177 bA	0.161 abA	0.554 aB	0.147 abcdA

Fonte: Autoria Própria

Nota: Letras iguais correspondem a médias iguais.

O crescimento normal das bactérias foi similar tanto para as bactérias isoladas quanto para as associadas. Foi estritamente diferente o crescimento do branco e da associação de dupla GH.

Para o biocida, o comportamento das bactérias foi semelhante em praticamente todos os casos, sendo diferente apenas entre uma associação de dupla e duas de trios. Nesse caso, o comportamento da média dos poços em branco seguiu o mesmo padrão de crescimento dos poços com bactérias, o que explica bactérias não formadoras ou fracamente formadoras quando aplicado o biocida como tratamento.

Os resultados para o óleo essencial de alfavaca não apresentaram diferenças significativas entre bactérias individuais, associação ou branco, sendo todos os valores considerados iguais estatisticamente. Por conta disso, a análise da formação de biofilme foi praticamente igual quando analisada a Tabela 2.

Com a água adicionada ao meio, novamente o crescimento das bactérias teve comportamento muito variado entre individuais, associações e branco, inclusive dentre dos próprios grupos.

Para as bactérias individuais, metade delas teve médias consideradas iguais para crescimento com biocida e água e a outra metade teve o óleo essencial de alfavaca com valores diferentes dos outros tratamentos.

Para as duplas, no geral foram os valores referentes ao óleo essencial de alfavaca que se mostraram diferentes ao restante. Já nos trios, em dois deles o biocida teve comportamento semelhante ao da água e diferente do crescimento normal e biocida e no outro, a associação teve comportamento diferente em todos os tratamentos.

Para as médias referentes aos poços em branco, o óleo essencial de alfavaca foi o único que teve comportamento diferente dos demais.

A diferença notável do comportamento das médias do óleo essencial de alfavaca em relação aos demais tratamentos pode ser justificada pela “falsa” aderência que ocorria nos poços por conta da viscosidade desse óleo, porém, como a anormalidade também seguiu para os poços em branco, foi possível realizar a análise comparativa entre os valores dos poços estudados com os poços em branco, sem alterar o resultado da formação do biofilme.

6 CONCLUSÕES

A maioria das bactérias encontradas foram Gram-positivas, e em maior parte com forma e arranjo correspondentes a estafilococos e bacilos.

As associações apresentaram, de maneira geral, diferença significativa na formação ou erradicação do biofilme, tendo comportamento semelhante ao de bactérias individuais, na maioria dos casos.

Foi possível perceber que o fluido de corte, independente da origem que tenha (vegetal ou mineral), é suscetível ao crescimento de biofilme, e que, apesar dos benefícios trazidos pelo uso do óleo essencial para tratamento deste problema, por se tratar de uma fonte renovável e limpa de recurso, a utilização do biocida sintético é mais eficiente para diminuição/remoção de biofilme.

Ensaio de susceptibilidade de biofilmes industriais a biocidas e óleos essenciais são pouco citados em literatura, porém o problema não deixa de ser importante, visto que o prejuízo das indústrias em descartar o material contaminado ainda é alto.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. O.; MACHADO, A. R.; SUAREZ, M. P.; BRITO, D. V. D. de; VIEIRA, D. S.; SEGATTO, F. Z. Influência da utilização de fluido de corte de base vegetal nas forças de usinagem no torneamento do aço ABNT 1050 e estudo do crescimento de microorganismos. Congresso brasileiro de engenharia de fabricação. Caxias do Sul, 2011.
- ALMEIDA, A. C. de; OLIVEIRA, L. de; PAULO, P. D. de; MARTINS E. R.; SOUZA, R. M. de; FIGUEIREDO, L. da S. de; SANTOS, C. A. dos; FONSECA, H. C. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) em carne moída de ovinos contaminada experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 20, n. 4, p.248-251, 2014.
- CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: FATEC – JB**. v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.
- CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado). Universidade federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- CASTRO, A. C.; NASCIMENTO, A. R.; TELES, A. M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. 53º Congresso Brasileiro de Química. Rio de Janeiro, 2013.
- CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: A new technology for the rapid determination of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.
- CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W. G. Physical and chemical properties of biofilms. **Biofilms**. Editora Jonh Wiley and sons. p. 93-130, 1990.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. (2013). ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese). R package version 1.1.2.

GONÇALVES, P. S. de C. **Boas Práticas ambientais na utilização de fluidos de corte nos processos de usinagem**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia – Universidade Estadual Paulista. Bauru, 2008.

GONÇALVES, J. F. de S. **Proposição de método de desenvolvimento de fluido de corte de base vegetal**. Tese (Doutorado). Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - Instituto Tecnológico de Aeronáutica. São José dos Campos, 2013.

GRUB, A. M. **Avaliação do desempenho de fluidos de corte contaminados no processo de torneamento do aço inoxidável austenítico V304UF**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Engenharia Mecânica. Uberlândia, 2013.

IRANI, R. A.; BAUER, R. J.; WARKENTIN, A. A review of cutting fluid application in the grinding process. **International Journal of Machine Tools & Manufacture**. n. 45, p. 1696-1705, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

LUCCHESI, E. G. **Influência de diferentes materiais na formação e susceptibilidade de biofilmes a agentes microbianos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12° ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARCELINO, L. I. de O. **Fluido de corte emulsionável: monitoramento, análise de degradabilidade, reformulação e estratégias de aumento de tempo de via no processo de retificação**. Dissertação (mestrado). CEFET – MG. Belo Horizonte, 2013.

McBAIN, A.J.; BARTOLO, R. G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R. G.; RICKARD, A. L.; SYMMONS, S. A.; GILBERT, P. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 177-185, 2003.

MILLEZI, A. F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2012.

MONTEIRO, C. L. B.; COGO, L. L.; GALARDA, I; FILHO, S. C. B. **Manual Teórico Prático de Procedimentos Básicos em Microbiologia Médica**. 3ª. ed. Curitiba, PR: UFPR, 2010.

MUNIZ, C. A. S. **Novas formulações de fluidos de corte: otimização, propriedades e recuperação do óleo usado**. Tese (doutorado). Centro de Ciências Exatas e da Terra - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2008.

OKURA, M. H. **Microbiologia**: roteiros de aulas práticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2008.

OLIVEIRA, J. F. G de; Alves, S. M. Adequação ambiental dos processos usinagem utilizando Produção mais Limpa como estratégia de gestão ambiental. **Produção**, v. 17, n. 1, p. 129-138, 2007.

OLIVEIRA, L. de. **Efeito inibitório dos óleos essenciais de alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e do suco de limão (*Citrus latifolia* Tanaka) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOTLER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**. p. 49-79, 2000.

PASSMAN, F. J. Biocides for lubricant rancidity and biofouling prevention. **Iron and steel engineers**, v. 74, n. 10, p. 41- 45, 1997.

PINTO, A. A. de S. **Sensibilidade de bactérias isoladas de fluido de corte a biocida sintético e natural**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental). Curso de Engenharia Ambiental - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

PIUBELI, F. A.; BIANCHI, E. C. Transtornos em operações de usinagem: Microrganismos no fluido de corte. 2º Congresso Brasileiro de Fabricação, Uberlândia, 2003.

PIUBELI, F. A.; GOMES, R.; ARRUDA, O.S.; ARRUMA, M. S. P.; BIANCHI, E. C.; SILVA JÚNIOR, C. E.; AGUIAR, P. R.; CATAI, R. E. Caracterização microbiológica de uma emulsão mineral utilizada como fluido de corte no processo de usinagem. **Revista Iberoamericana de Engenharia Mecânica**. v. 12, n.1, p. 35-41, 2008.

R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (syzygium aromaticum)**. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2010.

RUNGE, P. R. F.; DUARTE, G. N. Lubrificantes nas Indústrias – Produção, Manutenção e Controle. **Triboconcept – Edições Técnicas**, p. 71-171, 1990.

SANTOS, J. C.; C. FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina- PR, v. 32, n. 4, p.1557-1564, 2011.

SCHERER, R; WAGNER, R; DUARTE, M C T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-Índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILLIMAN, J. D. Cutting and Grinding Fluids: Selection and Application. **Society of Manufacturing Engineers**. 2ª edição, p. 1-47, 1992.

SOKOVIC, M.; MIJANOVIC, K. Ecological aspects of the cutting fluids and its influence on quantifiable parameters of the cutting processes. **Journal of Materials Processing Technology**. v. 109, p. 181-189, 2001.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N.; M.; NOGUEIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 43, p. 587-595, 2013.

THOMÉ, R.; BIANCHI, E.C.; ARRUDA, O.S.; AGUIAR, P.R. Estudo microbiológico das micobactérias e fungos contaminantes dos fluidos de corte. 8º Congresso Iberoamericano de Engenharia Mecânica. Cusco, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10º ed. Porto Alegre: Artmed 2012.

TRENT, E.M., WRIGHT, P.K. **Metal Cutting**. 4º ed. Butterworth-Heinemann: Oxford, 2000.

VEILLETTE, M.; THORNE, P. S.; GORDON, T.; DUCHAINE, C. Six month tracking of microbial growth in a metalworking fluid after system cleaning and recharging. **British Occupation hygiene Society**. v. 48, p. 541-546, 2001.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistemas dinâmicos**. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Exatas e da Terra - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2009.