

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

**ANA ALÍCIA DE SÁ PINTO**

**SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FLUIDO DE CORTE  
A BIOCIDA SINTÉTICO E NATURAL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**LONDRINA  
2015**

**ANA ALÍCIA DE SÁ PINTO**

**SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FLUIDO DE CORTE  
A BIOCIDA SINTÉTICO E NATURAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Kátia Valéria. M. C. Prates

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Isabel Moreira C. Andrei

**LONDRINA  
2015**



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do**  
**Paraná**



Câmpus Londrina  
Coordenação de Engenharia Ambiental

## TERMO DE APROVAÇÃO

### Título da Monografia

Sensibilidade de bactérias isoladas de fluido de corte a biocida sintético  
e natural

por

Ana Alícia de Sá Pinto

Monografia apresentada no dia 23 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.Ms. Bruno de Oliveira Freitas  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra Lyssa Setsuko Sakanaka  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates  
(UTFPR)  
Orientadora

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

**À memória de meu querido e amado avô,  
Syro Aparecido Pinto, que tanto ajudou  
e incentivou meus estudos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar saúde e forças para nunca desistir.

Ao meu pai Carlos e à minha mãe Vera por todo apoio, amor e carinho. Por sempre acreditarem em mim e pelo que sou.

Aos meus irmãos Ariana, Adriana e André por sempre cuidarem da caçulinha, mesmo à distância.

Aos meus avós, tios, tias e primos por todo apoio e incentivo.

Ao meu amado noivo Guilherme, pelos anos de amizade, pelos anos de namoro e agora de noivado. Pelo amor, carinho, dedicação, apoio e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos Danielle Hiromi Nakagawa, Laura Lahr, Luis Fernando Demétrio, Eduardo Rodrigues e Nathália Trevisan Alves pela amizade, pelas risadas, pelos bons e maus momentos, pela parceria, pelos conselhos e até pelas broncas.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Mariana Sbizzaro, Flávia Gonçalves, Pedro Presumido, Jaqueline Santos, Andressa Duarte, Michel Caetano, Vivian de Oliveira Lima, Lilian Costa, Franciyelli Pereira, Gabriella de Ornelas Menezes, Renan Polli, Camila Zoe, Gyselly Peterlini e Pamela Sá por toda ajuda dada.

Às professoras, Janaina Gonçalves, Isabel Moreira Craveiro Andrei e Lyssa Setsuko Sakanaka pela ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao professor Bruno Freitas pelas excelentes e proveitosas colaborações como banca de TCC1.

À minha primeira “mãe científica” Tatiane Cristina Dal Bosco por todo aprendizado, pelas oportunidades concedidas, pelo carinho e inspiração.

À minha querida orientadora de TCC, estágio e iniciação científica, “mãe científica” e amiga Kátia Valéria Marques Cardoso Prates pelo carinho ao longo dos últimos 3 anos, por todo amor, paciência, broncas, risadas e, principalmente, por todas as oportunidades concedidas e aprendizado.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram neste caminho percorrido durante a graduação.

## RESUMO

Pinto, Ana Alícia de Sá. **Sensibilidade de bactérias isoladas de fluido de corte a biocida sintético e natural**. 2015 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Curso de Engenharia Ambiental- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

A metalurgia é um setor secundário com importante participação no Produto Interno Bruto do país, gerando muitos empregos. Neste está inserida a usinagem, tendo um gasto estimado de 17% no gerenciamento de seus resíduos, sendo um deles o fluido de corte. O fluido de corte é substância altamente poluidora e seu tratamento é caro, por isso é desejável que o seu uso seja prolongado ao máximo. Uma das causas de degradação do fluido de corte, reduzindo o seu tempo de vida útil, são as bactérias. Para o controle desses microrganismos são usados biocidas sintéticos nos tanques de usinagem com fluido de corte. Esses biocidas podem aumentar o potencial poluidor do efluente produzido, além de ser prejudicial à saúde dos operadores das máquinas. Uma alternativa mais sustentável para o controle de bactérias seria a substituição de biocidas sintéticos por substâncias naturais, que possuam características antimicrobianas, como alguns óleos essenciais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de óleos essenciais de cravo-da-índia e alfavaca, na inibição do crescimento de bactérias de fluidos de corte de origem mineral e vegetal. Para isso foram selecionadas 8 colônias de bactérias das isoladas de fluido de corte mineral e 8 de fluido de corte vegetal de máquina de fresamento, que ficou em funcionamento por 3 meses com cada um dos fluidos. Estes isolados foram caracterizados morfológica e submetidos a testes de disco difusão com óleos essenciais de cravo-da-índia e alfavaca dissolvidos em etanol a 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5%, e biocida sintético a 1%. Em seguida, foi realizado teste de tempo de contato com os biocidas a 1%. Dos 8 isolados de fluido de corte mineral, 6 possuíam forma de cocos sendo 4 Gram positivos e 2 Gram negativos, os outros era bacilo, 1 negativo e outro positivo. Quanto ao teste de disco-difusão para estes isolados, 7 foram inibidos com óleo essencial de alfavaca, 6 com óleo essencial de cravo-da-índia e 6 com biocida. Já em relação ao tempo de inibição, enquanto 4 das 8 bactérias foram inibidos em 15 segundos pelo óleo essencial de cravo-da-índia, o menor tempo de inibição das bactérias com óleo essencial de alfavaca e biocida foi 2 minutos. Dos isolados de fluido de corte vegetal, 6 eram cocos Gram positivos e 2 bacilos Gram negativos. Destes isolados 6 foram inibidos pelo óleo de cravo-da-índia (1%), 4 pelo óleo de alfavaca (1%) e 2 pelo biocida. Em relação ao tempo de inibição com óleo essencial de cravo-da-índia: 3 isolados não foram inibidos, 2 foram inibidos em 1,5 minutos, 1 em 4,5, 1 em 5 minutos e outro em 20 minutos. Com alfavaca, 5 não foram inibidos, 1 foi inibido em 10 minutos e 2 em 20 minutos. O biocida não inibiu 5 dos isolados no tempo analisado, os outros 3 foram inibidos em 10, 20 e 30 minutos. Os óleos essenciais apresentaram melhor desempenho do que o biocida sintético, quando comparados à mesma concentração, tanto no número de isolado bacterianos (dos 2 fluidos) inibidos quanto em relação ao tempo em que isso ocorreu.

**Palavras-chave:** *Ocimum gratissimum*. *Syzygium aromaticum*. Eugenol. Controle de bactérias. Óleo essencial.

**ABSTRACT**

Pinto, Ana Alícia de Sá. **Sensibility of isolated bacteria from cutting fluid against natural and synthetic biocide.** 2015 50 p. Course Conclusion Work (Bachelorship in Environmental Engineering) - Course of Environmental Engineering - Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2015

Metallurgy is a secondary sector with an important role in the country's Gross Domestic Product, creating many jobs. In this one, machining is inserted, with an estimated expenditure of 17% in waste management, being cutting fluid part of this. Cutting fluid is a highly polluting substance with an expensive treatment, which that's why it is necessary to extend its use to the maximum. One of the responsible agent of the degradation of the cutting fluid, which reduces its lifetime, is bacteria. To control these microorganisms, synthetic biocides are used in the machining tanks filled with cutting fluid. These biocides can rise the polluting potential of the produced effluent, as well as being harmful to the machine operators' health. A sustainable alternative to control the bacteria would be the substitution of the synthetic biocides by natural substances with antimicrobial characteristics, like some essential oils. This way, the objective of this work was to test the efficiency of essential oils of clove basil and clove in the inhibition of bacteria growth in the cutting fluid of mineral and vegetable origin. It was selected from the 8 colonies of bacteria that was isolated from the mineral cutting fluid and 8 from the vegetable cutting fluid of milling machine, which was in operation for 3 months with each one of the fluids. These were characterized morphotintorial and submitted to disk diffusion testing with essential oils of clove basil and clove dissolved in ethanol 0,1, 0,5 , 1,0 , 2,5 and 5% and 1% synthetic biocide. From the 8 bacterias isolated of mineral cutting fluid, 6 had coccus form, being 4 Gram positive and 2 Gram negative, the others were bacillus (1 negative and 1 positive). The fusion disk test for showed that, 7 were inhibited with clove basil essential oil, 6 with clove essential oil and 6 with biocide. Now, regarding to inhibition time, while 4 from 8 bacteria were inhibited in 15 seconds using the clove essential oil, the shorter inhibition time of bacteria using clove basil and clove essential oil was of 2 minutes. Among the isolated ones of vegetal cutting fluid, 6 were Gram positive and 2 Gram negative coccus. Among these isolates, 6 were inhibited by clove oil (1%), 4 by clove basil oil (1%) e 2 by biocide. In relation to the inhibition time of clove essential oil: 3 isolates weren't inhibited, 2 were inhibited in 1,5 minutes, 1 in 4,5, 1 in 5 minutes and the other one in 20 minutes. Using clove basil, 5 weren't inhibited, 1 was inhibited in 10 minutes and 2 in 20 minutes. The biocide didn't inhibit 5 of the isolates in the analysed time, the other 3 were inhibited in 10, 20 and 30 minutes. The essential oils presents a better performance than the synthetic biocide, when compared to the same concentration, both in the number of bacteria isolates inhibited (both fluids), as in relation with the time of when this happened.

Keywords: ***Ocimum gratissimum*. *Syzygium aromaticum*. Eugenol. Bacteria control. Essential oil.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxogramas de Atividades executadas na pesquisa.....	21
Figura 2: Máquina de fresamento -(A) Vista frontal da máquina (B) Área onde a peça recebe o jato de fluido de corte (C) Reservatório de coleta de amostras .....	22
Figura 3: Fluxograma das etapas para o isolamento e a caracterização quanto ao Gram das bactérias provenientes do fluido de corte.....	23
Figura 4: (A) Diluição Seriada, (B) Inoculação e (C) Incubação .....	24
Figura 5: Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactéria...	25
Figura 6: Método de Coloração de Gram e aspecto das células após cada etapa. ..	26
Figura 7: Sequência de etapas da técnica disco-difusão .....	28
Figura 8: Resultado esperado da técnica disco-difusão .....	29
Figura 9: Procedimentos para análise do tempo mínimo de contato dos biocidas....	31
Figura 10: Resultado do teste disco- difusão .....	34
Figura 11:Três tipos de resultados obtidos nas análises de tempo de contato das bactérias com os biocidas. A- Inibição. B-Redução. C-Não houve inibição... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Aditivos do fluido de corte e suas funções.....	14
Quadro 2: Biocidas não oxidantes mais aplicados na usinagem.....	18
Quadro 3: Numeração dada a cada concentração dos agente antimicrobianos utilizados na análise de disco-difusão .....	28
Quadro 4: Pontos e tempos da análise do tempo de mínimo de contado das bactérias .....	30
Quadro 5: Bactérias isoladas do fluido de corte mineral, morfologia e tipo de Gram.....	32
Quadro 6: Bactérias isoladas do fluido de corte mineral, morfologia e tipo de Gram.....	33

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
3.1 FLUIDO DE CORTE .....	14
3.2 MICRORGANISMOS NO FLUIDO DE CORTE.....	16
3.3 CONTROLE DE MICRORGANISMOS .....	17
3.3.1 Biocidas Sintéticos .....	17
3.3.2 Biocidas Naturais .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE FLUIDO DE CORTE.....	22
4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	23
4.2.1 Diluição seriada.....	23
4.2.2 Inoculação e Incubação.....	24
4.2.3 Isolamento.....	25
4.2.4 Teste morfotintorial.....	25
4.3 TESTE DISCO-DIFUSÃO.....	26
4.4 TESTE DE TEMPO DE CONTATO DAS BACTÉRIAS COM OS BIOCIDAS.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 BACTÉRIAS ISOLADAS DOS FLUIDOS DE CORTE.....	32
5.2 TESTE DISCO-DIFUSÃO.....	33
5.3 TESTE DE TEMPO DE CONTATO DOS ISOLADOS BACTERIANOS COM BIOCIDAS NATURAL E SINTÉTICO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	43
7 RECOMENDAÇÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor metalúrgico tem papel importante na economia, pois as atividades como usinagem são a base para outras cadeias de produção, como a indústria automobilística, de construção civil e de bens de capital. Mesmo com alguns prejuízos causados pela crise mundial, o setor metalúrgico brasileiro cresceu 1,6% em 2011, em relação ao ano anterior. Avaliando o intervalo de 1970/2011, observa-se que a indústria tem crescido, com um PIB setorial de US\$ 17,2 bilhões, em 1970, para US\$ 58,7 bilhões, em 2011. Neste mesmo ano teve uma arrecadação por volta de US\$ 85 bilhões (BRASIL, 2012).

A indústria de usinagem é um importante segmento do setor metalúrgico, sua participação no PIB brasileiro no ano de 2009 foi de 13,3% (MUNDO DA USINAGEM, 2013). O setor de metalurgia básica, no qual está inserida a usinagem, gera aproximadamente 1,76 milhões empregos no país o que representa 7,3% dentro da indústria metalúrgica (CENTRO NACIONAL DE METALURGIA-CNM, 2011).

Dentro da metalurgia, 17% dos gastos de produção são investidos na manutenção e descarte de resíduos de um componente chamado fluido de corte (CENTRO DE INFORMAÇÃO METAL MECÂNICA, 2009b). O fluido de corte é uma substância complexa, composta por óleo e aditivos utilizados para facilitar o corte de peças de metal (SOKOVIC; MIJANOVIC 2001, IRANI 2005, LUFIT et al., 2011 GONÇALVES, 2013). Os componentes do fluido são nutritivos para microrganismos como as bactérias, que o degradam reduzindo a sua qualidade e tempo de uso (BIANCHI et al. 2008; LUFIT et al. 2011; PIUBELI et al.; 2008).

O descarte do fluido sem o tratamento adequado no meio ambiente causam problemas ao solo, ar e aos recursos hídricos, pois possuem substâncias complexas que podem ser poluidoras (LISBOA, MORAES e HIRASHITA, 2013). Vê-se então que o fluido de corte é uma substância que precisa ser tratada com muito cuidado, sendo interessante utilizá-lo ao máximo e tentar mitigar seu impacto ambiental quando descartado (LUFT et al., 2011).

Na indústria, para aumentar a vida útil dos fluidos de corte são usadas técnicas de inativação de microrganismos. Algumas dessas técnicas envolvem a aplicação de produtos químicos com propriedades antimicrobianas, os biocidas, nos tanques de usinagem (TAKAHASHI, 2005).

Devido a sua composição geralmente ser à base de fenol, o biocida sintético é um resíduo perigoso (PINTO, 2012) e uma opção para reduzir este problema é a utilização de produtos como biocidas naturais, provenientes de fonte renovável e que possuem características biodegradáveis, sendo mais sustentável ambientalmente. Entre os biocidas naturais, tem-se os óleos essenciais que vem sendo estudados para controle de microrganismos (RABÊLO, 2010; CASTRO et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014).

Desta forma, a proposta desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de bactérias isoladas de fluidos de corte – vegetal e mineral – a óleos essenciais, e compará-los a eficiência de um biocida sintético comumente aplicado em fluido de corte utilizado no processo de fresamento, que poderá vir a aumentar a vida útil do fluido de corte, e conseqüentemente, minimizar a geração de resíduos produzidos pelo segmento de usinagem.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade de bactérias isoladas de fluido de corte de origem vegetal e mineral a biocida natural (óleos essenciais) e compará-lo a eficiência de biocida sintético aplicado em fluido de corte utilizado no processo de fresamento.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar morfológicamente bactérias presentes nos fluidos de cortes de origem vegetal e mineral.
- Realizar testes de disco-difusão com biocida natural e biocida sintético para encontrar a menor concentração de inibição.
- Avaliar o tempo mínimo de contato para inibição dos isolados utilizando a melhor concentração encontrada dos biocidas naturais.
- Comparar a ação dos agentes biocidas natural e sintético.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 FLUIDO DE CORTE

O fluido de corte, comumente composto por água, óleo e aditivos, é utilizado na indústria metalúrgica, especificamente na área de usinagem (GONÇALVES, 2013 LUFIT et al., 2011; IRANI 2005; SOKOVIC; MIJANOVIC 2001). O óleo que o compõe pode ser de origem mineral, vegetal, sintético ou animal (WOSKIE, 2003).

Além do óleo, fluidos de cortes recebem outras substâncias químicas que melhoram as funções do fluido ou lhe acrescentam novas propriedades, chamadas de aditivos. No Quadro 1 são apresentados os principais aditivos de um fluido de corte e sua respectiva função.

Aditivos	Função
Antioxidantes	Proteger os fluidos de usinagem frente à ação agressiva da atmosfera
Emulsionantes	Estabilizar a emulsão
Inibidores da corrosão	Proteger a peça e a ferramenta
Biocidas	Impedir o desenvolvimento de microrganismos no fluido
Aditivos de extrema pressão	Formar uma capa intermediária entre as duas superfícies metálicas, melhorando a lubrificação e evitando o desgaste
Umectantes ou estabilizantes	Estabilizar o concentrado
Antiespumantes	Evitar a formação de espumas
Complexantes	Eliminar e prevenir a formação de incrustações
Outros	Detergentes, dispersantes

**Quadro 1: Aditivos do fluido de corte e suas funções**  
**Fonte: Centro Nacional de Tecnologias Limpas (2006).**

Na medida em que ocorrem os cortes das peças nas ferramentas das máquinas, o atrito entre os metais faz com que eles aqueçam. Esse aquecimento dilata as peças interferindo em suas dimensões pré-definidas. Dessa forma, é necessária à refrigeração pelo presença de um fluido (WITTE, 1998). Além disso, a lubrificação pelo fluido de corte é essencial, pois esse mesmo atrito causa vibração entre os metais, prejudicando o acabamento (WITTE, 1998)

Resumidamente os fluidos de corte, segundo Runge e Duarte (1990) devem ter as seguintes características:

- Capacidade refrigeradora;
- Lubrificante;
- Redutora de desgaste das ferramentas;
- De remoção de cavacos da área fluido de corte;
- Protetora contra a corrosão (a máquina, a ferramenta, a peça e os cavacos);
- De melhoramento do acabamento.

Com a constante utilização, a fadiga térmica, as reações químicas e a presença de microrganismos metabolizando os componentes do fluido ocorrem modificações na sua estrutura química degradando-o, sendo necessário o descarte e substituição do mesmo (CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIAS LIMPAS, 2006). A fim de prolongar a vida útil do fluido de corte é comum ocorrerem limpezas periódicas nas máquinas. Isso ocorre de acordo com as instruções previstas nos manuais de cada máquina, sendo a frequência de troca do fluido de 2 a 3 meses (CENTRO DE INFORMAÇÃO METAL MECÂNICA, 2009a).

Um dos problemas dessa troca é a diversidade de produtos contidos no fluido de corte que torna o tratamento difícil, e se lançados nos recursos hídricos ou solo provocam danos ao ecossistema e à população. Em corpos hídricos, por exemplo, ocorre a retirada do oxigênio da água necessário para a manutenção da vida (CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIAS LIMPAS, 2006).

Em estudo de caracterização de efluente metal-mecânico, Queissada, Silva e Paiva (2011), encontraram valor de pH de 1,7, de Demanda Química de Oxigênio de  $9147 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ , e a partir desses valores concluíram que o efluente de usinagem possui um alto potencial poluidor.

### 3.2 MICRORGANISMOS NO FLUIDO DE CORTE

Por conter componentes orgânicos o fluido de corte é fonte de energia para microrganismos (PIUBELI et al., 2003), e sendo ele um sistema aquoso, apresenta alta sensibilidade a contaminação microbiana (LIMA, 2012) Características físico-químicas, como pH e temperatura são adequadas para o desenvolvimento destes organismos (LIMA, 2012; POLITO et.al., 2006; PIUBELI et al., 2003).

Os microrganismos presentes no fluido de corte surgem da presença de roedores e insetos na área de usinagem (BENNET, 1972), das constantes atividades de usinagem e do contato com os operadores das máquinas que possuam microrganismos no trato respiratório e pele (BIANCHI et al., 2008). Piubeli et al.(2003) ressaltam que a presença de microrganismos encontrados em fluidos de corte surgem da falta de higiene dos operários que manuseiam as máquinas.

Esses microrganismos liberam substâncias ácidas que reduzem o pH do meio e aumentam a corrosividade do fluido, esgotam seus aditivos (MOREIRA et al., 2012; PIUBELI et al., 2008), e conseqüentemente, a redução do tempo de vida útil do fluido. Outro problema causado pela proliferação desses microrganismos é a transmissão de doenças aos operários, em particular as respiratórias e as da derme (PIUBELI, 2008).

Os organismos mais comuns encontrados no microambiente formado pelo fluido de corte são as algas, os fungos, leveduras e principalmente as bactérias, responsáveis por causar danos de corrosão do material metálico durante o processo de usinagem das peças (LIMA, 2012).

O que torna proliferação de bactérias mais abundante é a composição do fluido, por conter substâncias formadas por grandes cadeias de hidrocarbonetos e água formam um sistema nutritivo que atendem suas necessidades fisiológicas (BIANCHI et al., 2007; LUFIT et al., 2011).

O desenvolvimento de bactérias causa odores altamente desagradáveis, podem manchar as peças, as máquinas, reduzir o tempo de vida do fluido e transmitir doenças (CAPELLETTI, 2006). Dentre as bactérias patogênicas é possível citar, *Staphylococcus aureus* (ocasiona infecções na pele), *Streptococcus pyogenes* (causa irritação na garganta), *Pseudomonas pyanocea* (provoca intoxicação

alimentar) *Proteus mirabilis* (infecções respiratórias, urinária e de pele), *Escherichia coli* e *Shigella* sp (ocasionam disenteria) (GRUB, 2013, POLITO, 2006).

### 3.3 CONTROLE DE MICRORGANISMOS

A contaminação por microrganismos gera situações como transmissão de doenças e a diminuição de vida útil dos fluidos de cortes, decorrente da biodegradação fazendo-se necessária a utilização de técnicas de controle de proliferação. Polito et al. (2006) em estudo de revisão sugerem uma divisão em três grupos de técnicas de controle microbiológicas, que são: fluidos biorresistentes, tratamentos físicos e controle por meio da utilização de biocidas.

Fluidos biorresistentes são fluidos utilizados com proporções menores de água e grandes concentrações de agentes bactericidas e fungicidas, essas características tornam o fluido menos susceptível à contaminação de microrganismos e conseqüentemente reduzem a biodegradação (POLITO et al., 2006).

Com relação aos tratamentos físicos destaca-se o emprego da radiação ultravioleta, sendo o tipo mais usado no segmento de usinagem os raios UV-C (comprimento de onda de 260 nm). A radiação UV-C penetra na parede celular dos microrganismos e provoca um desarranjo na cadeia de DNA, prejudicando a capacidade de reprodução (BIANCHI et al., 2008).

A técnica mais empregada é o uso de biocidas sintéticos, que são substâncias químicas aplicadas ao fluido de corte com o objetivo de impedir o desenvolvimento de microrganismos, agindo como bactericida, fungicida ou algicida. Essa aplicação controla e previne a biodeterioração (POLITO et al., 2006; TAKAHASHI, 2012; ABIQUIM, 2015).

#### 3.3.1 Biocidas Sintéticos

A aplicação de biocidas sintéticos é feita para diminuir substancialmente a contaminação. Para isso, é necessário um biocida de ação rápida e de características prolongada, não dando tempo para a proliferação dos

microrganismos. Entretanto, o uso em excesso gera gastos desnecessários e pode causar dermatites nos operadores, o que torna necessária a determinação correta da dosagem dos biocidas (TAKAHASHI, 2005).

Os biocidas sintéticos podem ser diferenciados em dois grupos: os oxidantes e os não oxidantes. Os biocidas oxidantes tem como princípio a oxidação dos componentes orgânicos presentes nos microrganismos, ocorrendo degradação das estruturas vitais e conseqüentemente morte dos indivíduos. Os principais representantes são: cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio (PERES, 2006).

Quando se utiliza biocidas oxidantes, devido à ação de oxidação dos compostos constituintes das células, todos os tipos de microrganismos são atingidos, entretanto, por esses produtos serem facilmente reativos podem alterar a composição original do fluido e corroer equipamentos e tubulações (CAPELLETI, 2006).

Já os biocidas não oxidantes são compostos por substâncias sulfuradas, isotiazolinona, aldeídos, e halogenados, cada um deles tem a função de combater microrganismos atacando partes específicas da célula, reagindo pouco com outros aditivos do fluido, por isso são os mais usados na indústria (CAPELLETI, 2006; PERES, 2006). No Quadro 2, são listados alguns dos biocidas não oxidantes mais aplicados na usinagem.

Grupo	Nome comercial de ativos	Componente celular-alvo
Compostos sulfurados	Tiocianometiltiobenzotiazol (TCMTB)	Membrana (reação com enzimas e grupos S-H)
Compostos de Isotiazolinona	Clorometilisotiazolinona Metilisotiazolinona	Parede; membrana; citoplasma (coagulação de proteínas)
Aldeídos	Triazina Dimetiluréia	Parede celular
Derivados de halogenados	Bronopol Iodopropinilbutilcarbanato	Parede celular; membrana (enzimas e grupos S-H); citoplasma (grupo tiol e amino)

**Quadro 2: Biocidas não oxidantes mais aplicados na usinagem**

Fonte: Capelleti, 2006.

### 3.3.2 Biocidas Naturais

Alguns óleos essenciais podem agir como biocidas naturais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007) define óleos essenciais como: “produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com

vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)”. São substâncias que apresentam forte odor e são fabricados a partir de metabólitos secundários de plantas aromáticas, tais como: sementes, flores, folhas, cascas, frutos, madeira, raízes (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010), brotos e caules (BURT, 2004; BAKKALI, 2008; TEIXEIRA, 2013). Ficam guardados nas células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas granular (BURT, 2004; BAKKALI, 2008; TEIXEIRA, 2013).

Os óleos essenciais possuem atividade antisséptica, isto é, tem funções bactericida, fungicida e virucida (PEREIRA, 2010; BAKKALI et al. 2008). Além de propriedades medicinais e que realçam o sabor, eles aplicam-se também para preservar alimentos, como antibióticos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico e anestésico local (BAKKALI et al., 2008). São geralmente biodegradáveis e de baixa toxicidade aos mamíferos (FIGUEIREDO et a., 2008).

A capacidade biocida desses óleos essenciais provem de substâncias tais como carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, metol, timol, limoneno, eugenol e outros (LAMBERT et al, 2001).

O eugenol tem o mecanismo de ação antimicrobiano que que consiste na capacidade de penetrar na membrana citoplasmática das células bacterianas rompendo-as e fazendo com que ocorra o extravazamento do conteúdo celular, ocasionando sua morte (AFFONSO et al, 2012).

Um óleo essencial utilizado como antimicrobiano é o proveniente do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (SILVA, OLIVEIRA e SOUZA, 2011) que se origina de pequenas flores branco-amareladas de uma árvore de grande porte que pode variar de 12 a 15 metros de altura, e seu tempo de vida é aproximadamente, 100 anos (RABÊLO, 2010). A composição do óleo essencial de cravo-da-índia é majoritariamente eugenol, se destacando com 83,75%, seguida por  $\beta$ -cariofileno, com 10,98%, e com 1,26%, o  $\alpha$ -humuleno, há também outras substâncias, mas em proporções insignificantes (SCHERER et al, 2009).

Estudos sugerem que o óleo essencial do cravo da índia possui atividade antimicrobiana, o que pode ser observado por Rabêlo (2010) que teve bons resultados ao testar em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella SP*. Almeida et al.(2014), comprovaram ação antimicrobiana em teste feito com carne de ovino contaminada com *Staphylococcus aureus* e Santos et al. (2011) que obtiveram

resultado positivo para todas as bactérias que testaram (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella cholerasuis*).

Outro óleo essencial que também possui como componente principal o eugenol, é originado do *Ocimum gratissimum*, planta conhecida popularmente como Alfavaca, Alfavacão e Alfavaca Cravo. É um subarbusto aromático que pode atingir até 1 m de altura, suas folhas são ovalado-lanceoladas. O óleo essencial composto de 77,3 % de eugenol, 12,1% de 1,8-cienol, 2,3 % b-cariofileno, e 2,1% (Z)-ocimeno (LORENZI e MATOS, 2002).

Almeida et al. (2014) pesquisou a atividade antimicrobiana dos óleos citados e obteve resultados positivos na inativação de bactérias inoculadas na relação, 400µL para cada grama de carne.

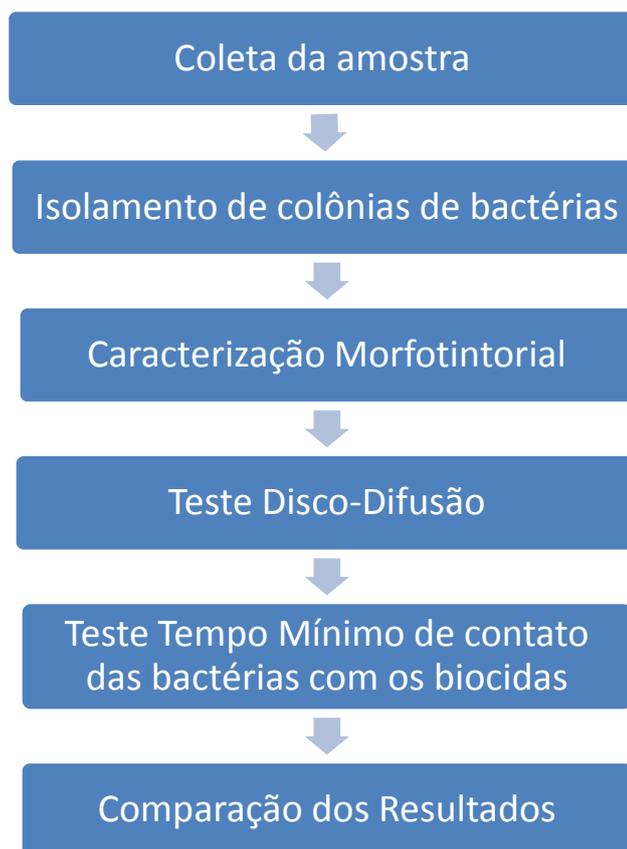
Já Castro et al. (2013), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) puro, frente a bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, e concluíram que eram sensíveis ao óleo.

Pereira et al. (2008) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia diluído em etanol nas concentrações 0,1, 0,5, e 1%, em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e observaram inibição por meio da formação de halos.

Santos Junior et al. (2011), também estudou a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* a óleo essencial de cravo-da-índia diluído em etanol em concentrações que variaram de 0,1 a 50%, e foram observados resultados satisfatórios.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico são apresentadas as atividades realizadas para avaliar a sensibilidade das bactérias isoladas a partir dos fluidos de corte (Figura 1).

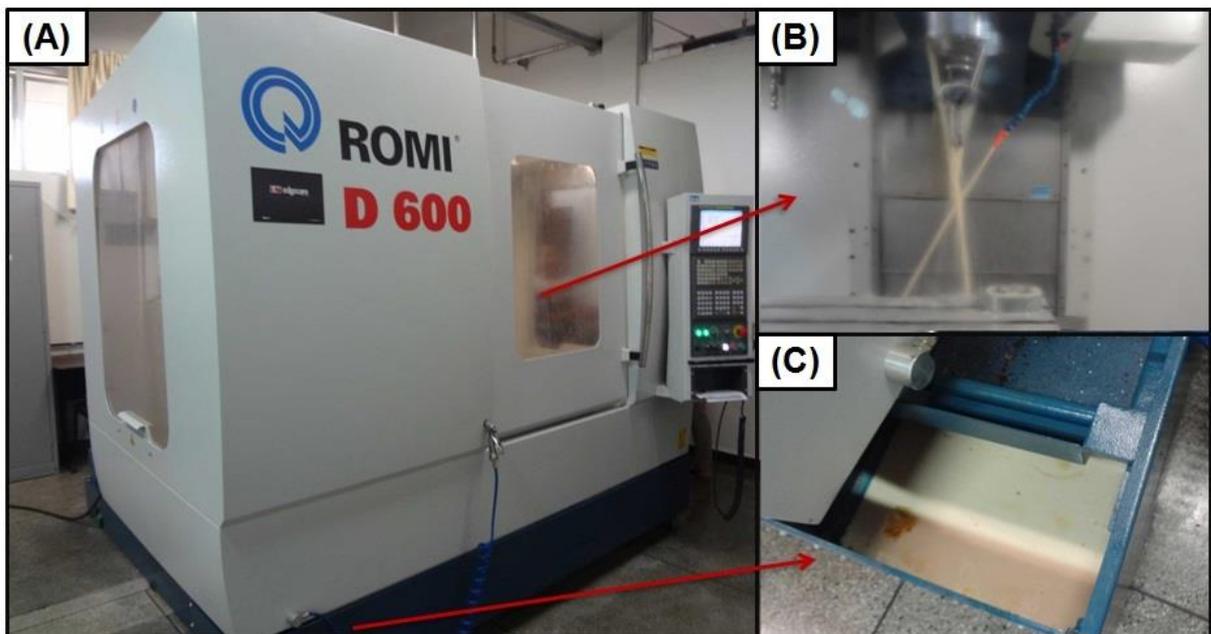


**Figura 1** Etapas Atividades executadas na pesquisa.  
**Fonte:** Autoria própria

#### 4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE FLUIDO DE CORTE

As amostras foram coletadas semanalmente durante três meses de funcionamento da máquina com fluido de corte a base de óleo mineral e por mais três meses, depois da troca, por fluido a base de óleo vegetal. A máquina de fresamento (Figura 2) utilizada para coleta das amostras estava em funcionamento no Laboratório de Comando Numérico Computadorizado da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Câmpus* Cornélio Procópio.

As amostras foram coletadas do reservatório (mostrado na Figura 2 C).

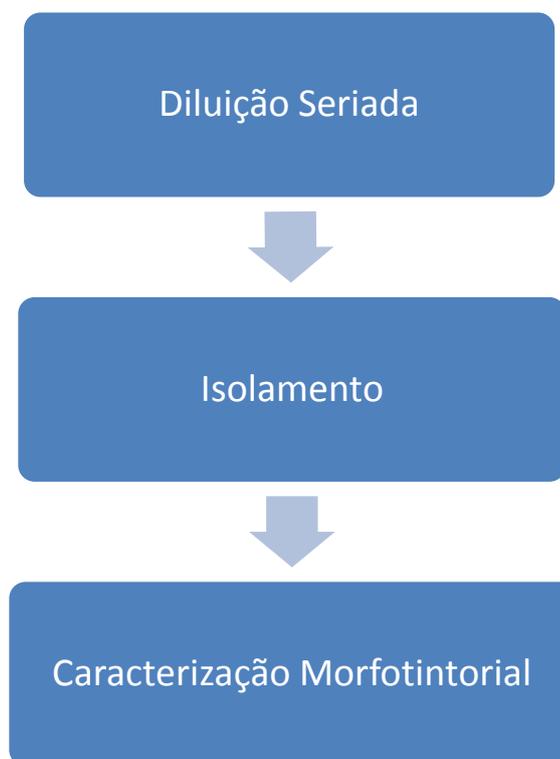


**Figura 2: Máquina de fresamento - (A) Vista frontal da máquina (B) Área onde a peça recebe o jato de fluido de corte (C) Reservatório de coleta de amostras**  
Fonte: Nakagawa, 2015.

Para cada coleta de amostra (100mL) foi utilizada uma pipeta graduada estéril. As amostras foram armazenadas em frascos de tampa de rosca previamente esterilizados e para o transporte, foi utilizado caixa de isopor com gelo para que as amostras se mantivessem refrigeradas até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Câmpus* Londrina para as análises microbiológicas de isolamento e teste de disco de difusão e de tempo mínimo de contato.

## 4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Com a finalidade de isolar e realizar a caracterização morfotintorial das bactérias presentes nos fluidos de corte mineral e vegetal durante o período de análises foram realizadas a sequência de atividades que são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3** Etapas para o isolamento e a caracterização morfotintorial das bactérias provenientes do fluido de corte.  
**Fonte:** Autoria Própria.

### 4.2.1 Diluição seriada

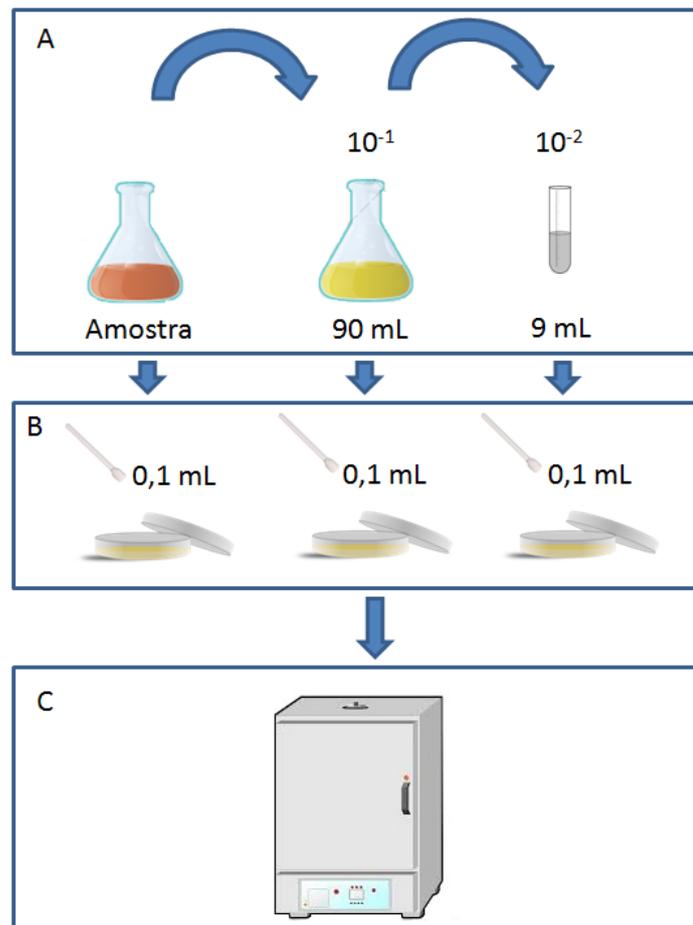
Para analisar o crescimento de colônias de bactérias provenientes das amostras de fluidos de corte, foi realizada a diluição seriada seguindo Monteiro et al. (2010). Inseriu-se 10 mL da amostra em um erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina a 0,8%, obtendo assim a diluição  $10^{-1}$ .

Posteriormente foi retirada uma alíquota de 1 mL da diluição  $10^{-1}$ , que por sua vez, foi inserida em um tubo de ensaio contendo 9 mL da solução para a obter da diluição  $10^{-2}$ . Este processo pode ser observado na Figura 4-A.

#### 4.2.2 Inoculação e Incubação

Depois de realizada a diluição seriada, para a inoculação, segundo Carvalho (2010), foi retirada 0,1 mL de cada diluição e inoculadas em placas de Petri com meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) e espalhadas com *swab* estéril (Figura 4-B).

Após a secagem as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h (Figura 4-C).

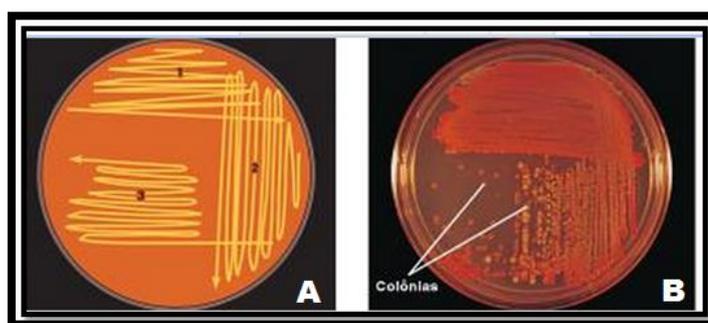


**Figura 4** Procedimentos para isolamento de colônias de bactérias provenientes do fluido de corte (A) Diluição Seriada, (B) Inoculação e (C) Incubação.

Fonte: Autoria Própria.

### 4.2.3 Isolamento

A fim de isolar as bactérias, foi utilizada a técnica de isolamento por estrias (técnica de esgotamento), seguindo a metodologia descrita por Monteiro et al. (2010). Com o auxílio de uma alça de inoculação, uma colônia foi retirada de uma das placas de Petri contendo crescimento bacteriano. Para garantir que houvesse uma colônia pura, foi semeada em estrias na superfície do meio PCA estéril e as placas de Petri foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h em estufa bacteriológica. Foram feitos três grupos de estrias esterilizando a alça a cada nova seção. As últimas colônias ficaram afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas, conforme representado na Figura 5.



**Figura 5 Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactéria (A) Estriamento (B) Colônias isoladas após esgotamento. Fonte: Tortora, Funke e Case, 2012.**

Após isolamento, as bactérias foram colocadas em *ependorffs*, contendo BHI e glicerol, e estocadas em freezer para serem utilizadas nos testes posteriores.

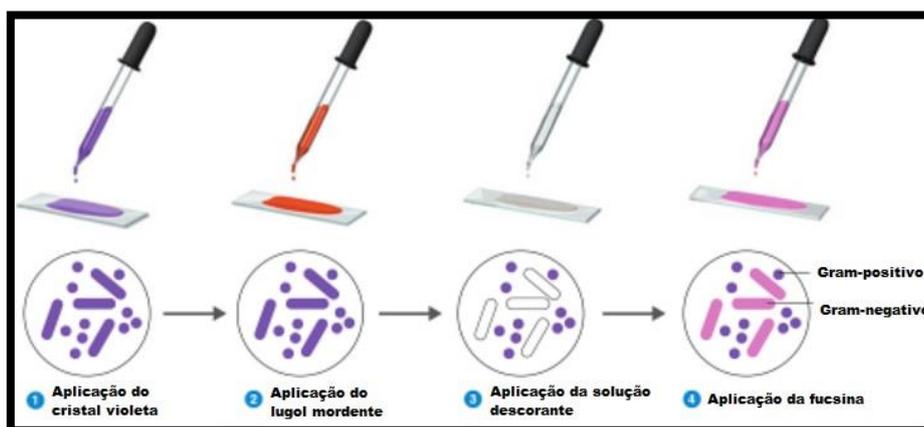
### 4.2.4 Caracterização morfotintorial

Para reconhecer a forma, e a resposta a coloração de Gram das bactérias isoladas, foi realizada a metodologia de preparação de lâminas segundo Monteiro et al. (2010). Para isto, uma lâmina limpa foi flambada em bico de Bunsen, depois que estava fria, foi adicionada uma gota de água estéril no centro da lâmina. A colônia que se desejava estudar foi tocada com a alça de inoculação estéril e esfregada em

movimentos ovais na gota de água. Após a gota de água evaporar, o esfregaço foi fixado passando a lâmina rapidamente três vezes na chama do bico de Bunsen.

Após a preparação do esfregaço, a lâmina foi coberta com cristal violeta e passado um minuto lavada com água destilada. Em seguida, a lâmina foi coberta por lugol mordente pelo mesmo tempo e lavada com água destilada. Com a lâmina inclinada, aplicou-se solução descorante por aproximadamente 15 segundos e posteriormente foi lavada com água destilada. Por último, aplicou-se fucsina por 30 segundos e depois foi lavada com água destilada. Após a coloração, esperou-se até que a lâmina estivesse totalmente seca para ser observada em microscópio.

As colônias de bactérias classificadas como Gram positivas ficaram roxas e as negativas entre rosa e vermelho, a técnica de coloração de Gram está ilustrada na Figura 6.



**Figura 6: Método de Coloração de Gram e aspecto das células após cada etapa.**  
 Fonte: Adaptado de Tortora, Funke e Case, 2012.

### 4.3 TESTE DISCO-DIFUSÃO

O teste de Disco-Difusão foi realizado com oito isolados bacterianos de cada fluido de corte escolhidos aleatoriamente, totalizando 16 isolados testados com a finalidade de encontrar as concentrações mínimas em que ocorre a inibição do crescimento bacteriano.

Para a realização dos testes foram avaliados dois óleos essenciais (óleo de cravo-da-índia e óleo de alfavaca) e um biocida sintético comumente utilizado em fluidos de corte.

Os isolados bacterianos foram semeados em placas de Petri contendo *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) a partir dos estoques descritos no item 4.2.3 e mantidas por 24h em estufa bacteriológica.

A metodologia do Disco-Difusão seguiu as orientações da ANVISA (2008), que padroniza as bactérias pela escala nefelométrica de McFarland.

Essa padronização consistiu na inserção de alçadas com cultura bacteriana provenientes das placas em solução salina até que a turvação das bactérias em suspensão fosse a mesma da escala. Para esse trabalho, foi utilizado o número 0,5 da escala, que corresponde a  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL.

Depois de padronizadas, 0,1mL da solução das bactérias foram inoculados pela técnica de espalhamento em placas de Petri contendo meio ágar Müller Hinton.

Posteriormente, discos de papel filtro da marca Qualy com 5 mm de diâmetro foram inseridos nas placas e neles aplicados 5 µL do biocida em estudo, segundo metodologia adaptada de Millezzi (2012).

Os óleos essenciais foram previamente diluídos em etanol a 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5%, segundo a metodologia adaptada de Santos et al. (2011), e o biocida sintético (Rocol Ultraguard SC) a 1% (recomendação do fabricante).

Além das 5 concentrações de cada óleo essencial e do biocida a 1%, utilizou-se discos nos quais foram aplicados etanol (100%) para se avaliar o efeito deste no crescimento das bactérias estudadas. O valor do halo formado pelo etanol foi descontado do halo formado pelos óleos essenciais.

O código de identificação utilizado para cada concentração dos agentes antimicrobiano é apresentada no Quadro 3

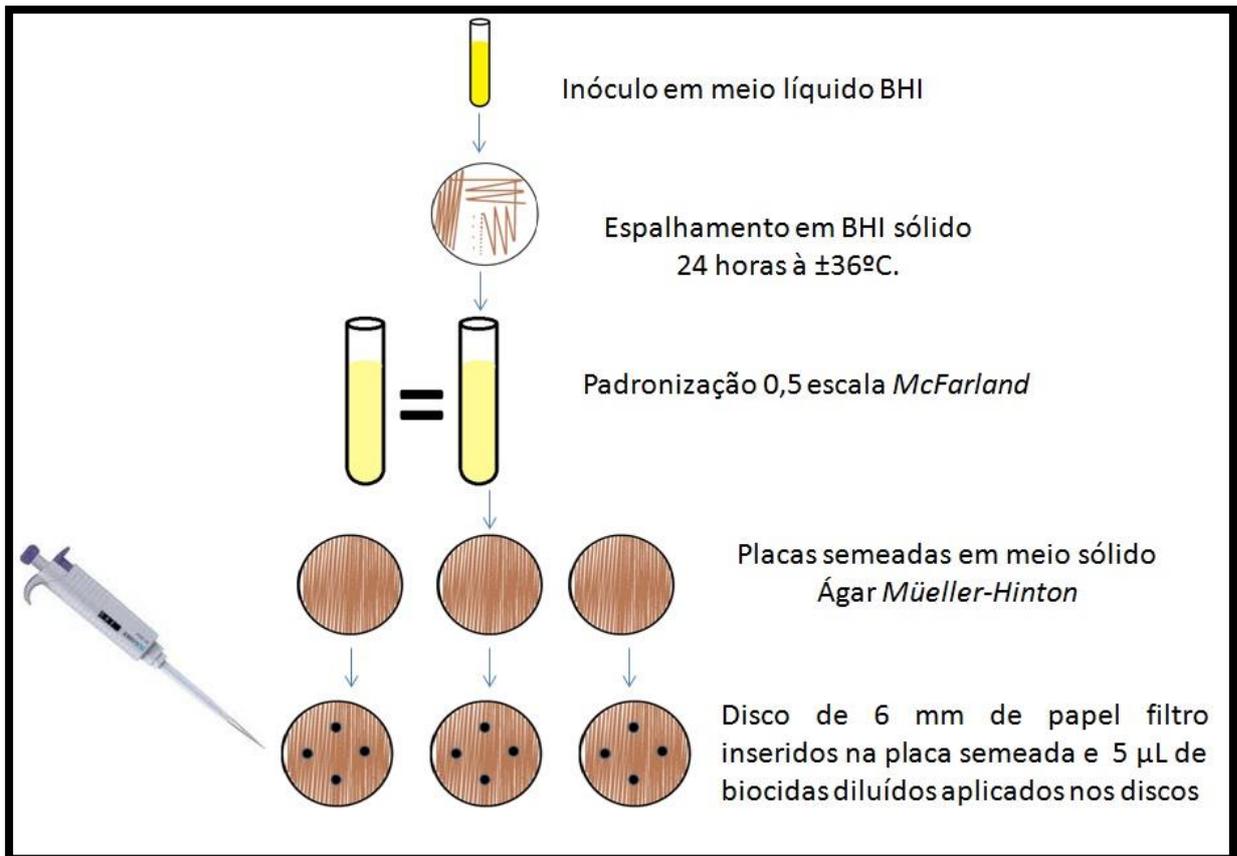
<b>Código de Identificação</b>	<b>Óleo essencial, Biocida e Etanol</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	Cravo-da-índia	0,1
2	Cravo-da-índia	0,5
3	Cravo-da-índia	1,0
4	Cravo-da-índia	2,5
5	Cravo-da-índia	5,0
6	Alfavaca	0,1
7	Alfavaca	0,5
8	Alfavaca	1,0
9	Alfavaca	2,5
10	Alfavaca	5,0
11	Biocida	1,0
12	Etanol	100

**Quadro 3: Código de identificação para cada concentração dos agente antimicrobianos testados na análise de disco-difusão**

Fonte: Autoria própria

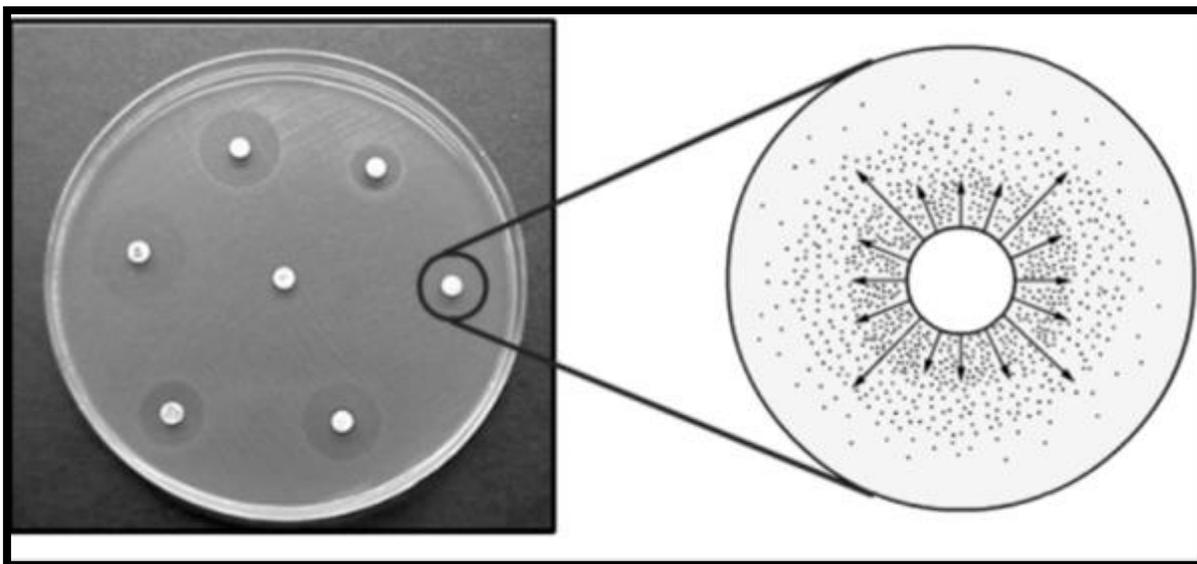
Também foram mantidas placas inoculadas sem aplicação do biocida, para controle positivo (confirmação de crescimento) e placas não inoculadas para controle negativo (confirmação de esterilidade do meio).

O teste foi realizado em triplicata, e as placas foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h. A sequência dos passos é ilustrada na Figura 7.



**Figura 7: Sequência de etapas da técnica disco-difusão**  
Fonte: Autoria própria.

Os halos (mensurados em mm) formados às bordas dos discos indicaram a sensibilidade da bactéria ao biocida como pode ser visto na Figura 8.



**Figura 8: Representação da formação de halos de inibição obtidos pela da técnica disco-difusão**

Fonte: ANVISA, 2008

A Concentração Mínima Inibitória que é a menor concentração em que haja efeito bacteriostático, isto é, formação de halos onde não ocorra desenvolvimento microbiano, foi definida segundo Oliveira et al. (2011a).

Para os isolados bacterianos que não sofreram inibição do etanol, considerou-se o diâmetro do halo total formado. Para elaboração dos gráficos, as bactérias que não sofreram inibição pelo etanol, foi considerado o diâmetro do halo imediatamente acima da linha horizontal dos gráficos que delimita o halo do etanol para cada isolado.

#### 4.4 TESTE DE TEMPO DE CONTATO DAS BACTÉRIAS COM OS BIOCIDAS

Depois de encontrada a melhor concentração das biocidas testados foi realizado o teste de tempo mínimo de contato segundo metodologia adaptada de Ferreira (2015) para avaliar o tempo de inativação das bactérias.

Para isso, da mesma forma como no teste disco-difusão, as bactérias isoladas foram enriquecidas em meio líquido BHI e semeadas em BHI sólido, após 24h em estufa bacteriológica foram padronizadas pela escala 0,5 McFarland.

O etanol foi utilizado apenas como solvente, para certificar que o mesmo não se comportaria como agente inibidor foram feitos teste prévios com todos os isolados bacterianos selecionados, variando a concentração do etanol até chegar aos valores: biocida/óleo essencial (500 $\mu$ L), solução salina (1460 $\mu$ L) e etanol (1460  $\mu$ L).

Da padronização de McFarland do isolado bacteriano, foi retirada 1,2 mL que foram colocados em tubos estéreis, posteriormente misturou-se neste tubo 0,8 mL da solução do agente microbiano e ficaram submetidos à agitação, os primeiros 5 minutos em *vortex* e o restante do tempo em Incubadora *shaker*.

Em uma placa com BHI sólido, dividida em 14 partes, foi inoculada uma gota de 5 $\mu$ L da mistura do tubo nos tempos conforme a o Quadro 4.

Pontos	Tempo
1	15 segundos
2	30 segundos
3	1 minuto
4	1,5 minutos
5	2 minutos
6	2,5 minutos
7	3 minutos
8	3,5 minutos
9	4 minutos
10	4,5 minutos
11	5 minutos
12	10 minutos
13	20 minutos
14	30 minutos

**Quadro 4: Pontos e tempos da análise do tempo de mínimo de contado das bactérias**

**Fonte: Autoria Própria**

Esse teste foi realizado nos 16 isolados bacterianos (8 de cada tipo fluido de corte) para os 2 óleos essenciais e o biocida, totalizando 48 análises.

O teste foi realizado em triplicata, além de controle negativo e positivo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Os procedimentos realizados para a análise e tempo mínimo de contato com os biocidas são mostrados na Figura 9.

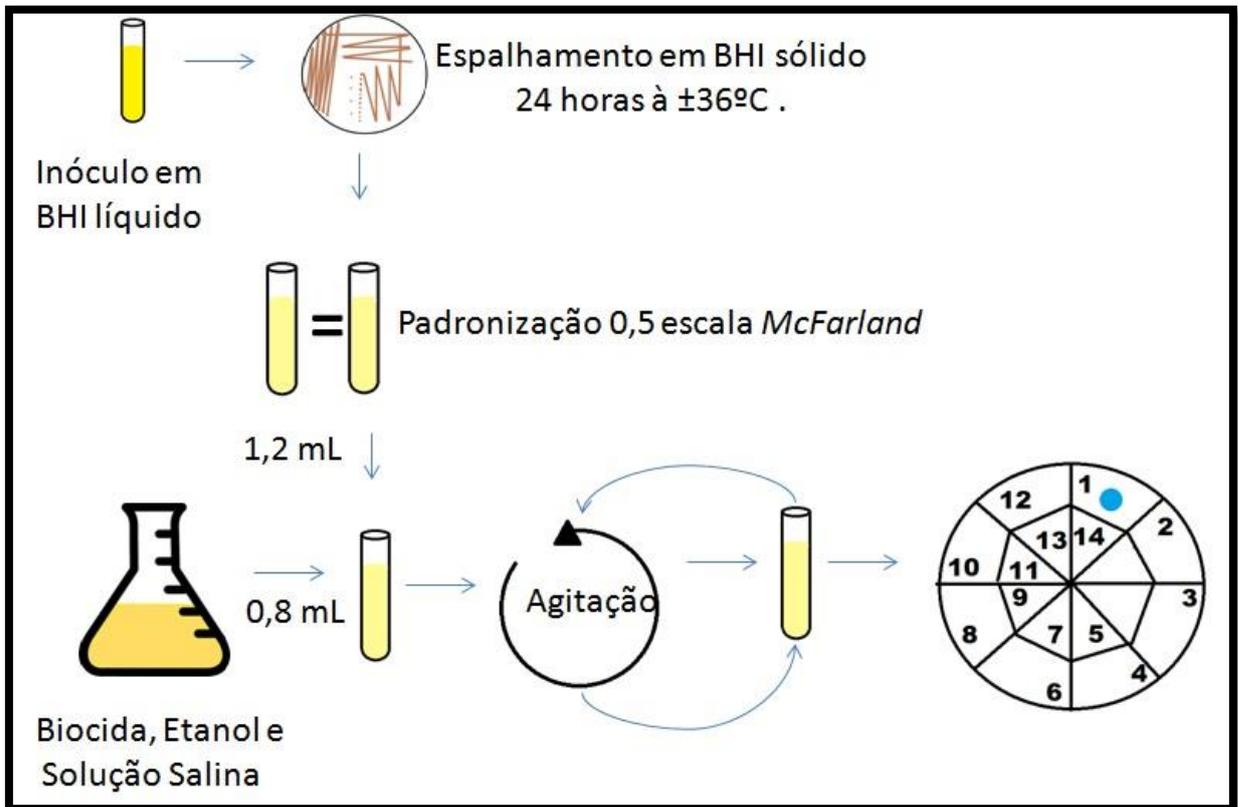


Figura 9: Procedimentos para análise do tempo mínimo de contato dos biocidas  
Fonte: Autoria própria

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão expostos os dados das análises desenvolvidas durante o a fase experimental deste trabalho.

### 5.1 BACTÉRIAS ISOLADAS DOS FLUIDOS DE CORTE

Durante o período de coleta das amostras de fluido de corte mineral, foram selecionados, aleatoriamente, 8 dos 65 isolados bacterianos. No Quadro 5 são apresentadas as bactérias isoladas do fluido de corte mineral, a morfologia identificada e o tipo de parede celular (Gram positiva ou Gram negativa).

Bactéria	Morfologia	Gram
FCM1	Bacilo	-
FCM2	Coco	+
FCM3	Coco	+
FCM4	Coco	+
FCM5	Bacilo	+
FCM6	Coco	-
FCM7	Coco	+
FCM8	Coco	-

**Quadro 5: Bactérias isoladas do fluido de corte mineral, morfologia e classificação quanto ao Gram**

**Fonte: Autoria Própria**

Observando o Quadro 5 é possível concluir que, dos 8 isolados bacterianos selecionados do fluido mineral, 6 eram de morfologia coco dos quais 4 foram classificados como Gram positivos e 2 como Gram negativos. Já os 2 bacilos selecionados, 1 era Gram positivo e 1 Gram negativo.

Já das amostras coletadas do fluido de corte vegetal foram isolados 55 bactérias, das quais foram selecionadas 8, também aleatoriamente. No Quadro 6

são apresentadas as bactérias isoladas do fluido de corte vegetal, a morfologia identificada e o tipo de parede celular (Gram positiva ou Gram negativa).

Bactéria	Morfologia	Gram
FCV1	Coco	+
FCV2	Coco	+
FCV3	Bacilo	-
FCV4	Coco	+
FCV5	Coco	+
FCV6	Bacilo	-
FCV7	Coco	+
FCV8	Coco	+

**Quadro 6: Bactérias isoladas do fluido de corte mineral, morfologia e classificação quanto ao de Gram**

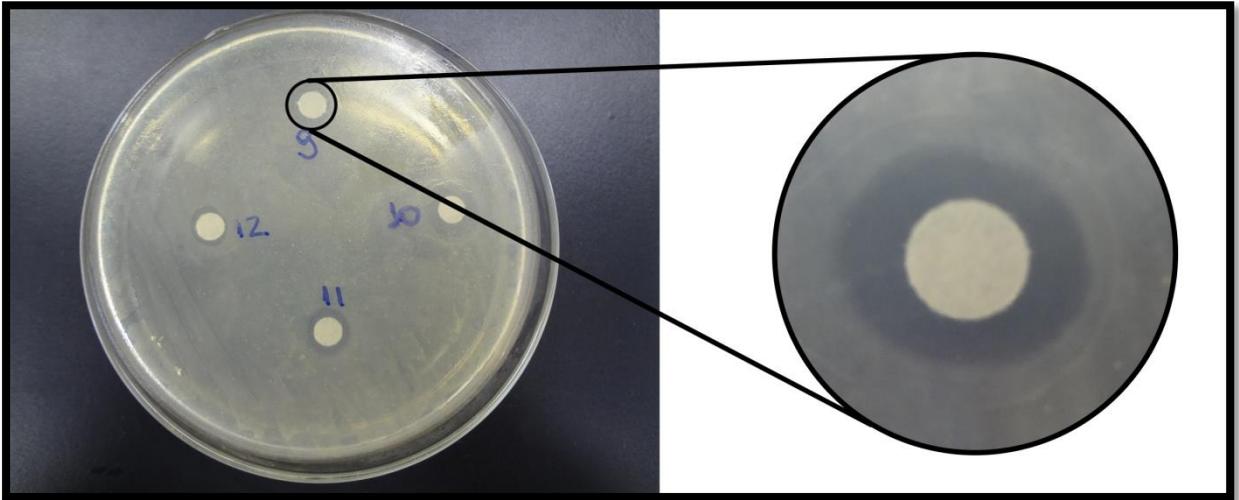
**Fonte: Aatoria Própria**

Nota-se pelo Quadro 6 que da mesma forma como no fluido de corte mineral, no fluido de corte vegetal, dos isolados bacterianos selecionados, 6 possuíam morfologia cocos. Mas desta vez, os 6 foram identificados com parede celular Gram positiva. E, as 2 morfologias de bacilos caracterizadas, foram classificadas como Gram negativa.

Foi observado, tanto em isolados bacterianos de fluido de corte mineral quanto vegetal, a predominância de cocos Gram positivos. Resultado oposto encontrado por Piubelli et al. (2008), que identificaram a maior quantidade de isolados bacilos Gram negativos, e mesmo assim, segundo maior número de isolados em seus estudos foram, os cocos Gram positivos.

## 5.2 TESTE DISCO-DIFUSÃO

A análise do teste de disco-difusão dos isolados bacterianos permitiu visualizar, após 24h de incubação, a presença de halos de inibição às bordas dos discos pela ação dos biocidas, como mostrado na Figura 10.

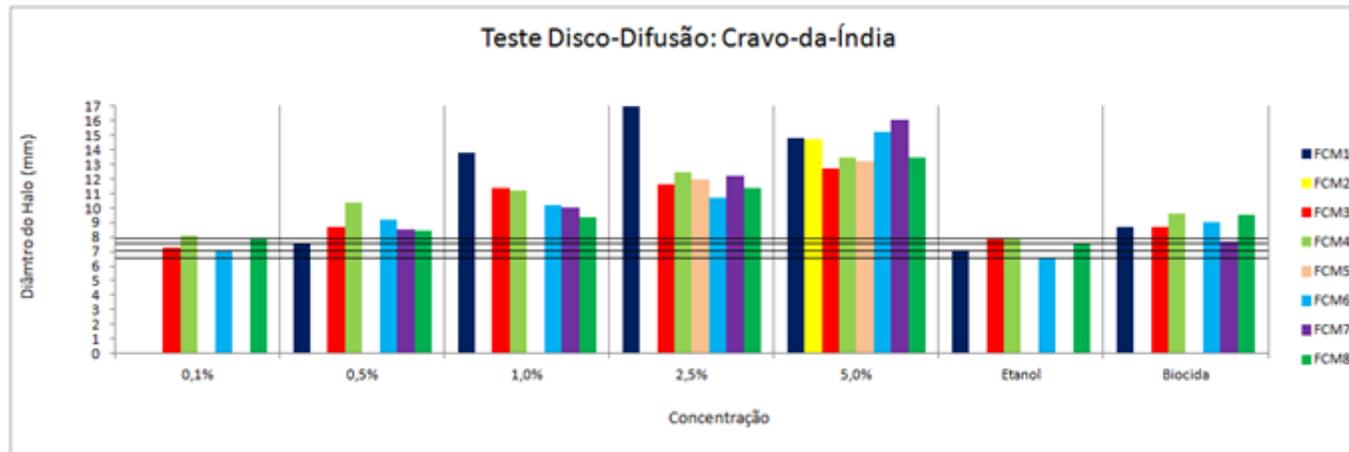


**Figura 10: Resultado do teste disco- difusão utilizando biocida em isolados bacteriano proveniente de fluido de corte.**

**Fonte: Autoria própria**

As Figuras 11 e 12 apresentam os resultados do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem mineral utilizando o óleo essencial de cravo-da-índia e alfavaca, respectivamente, além dos valores obtidos para o biocida sintético e etanol. As linhas horizontais traçadas indicam o tamanho do halo formado pelo etanol.

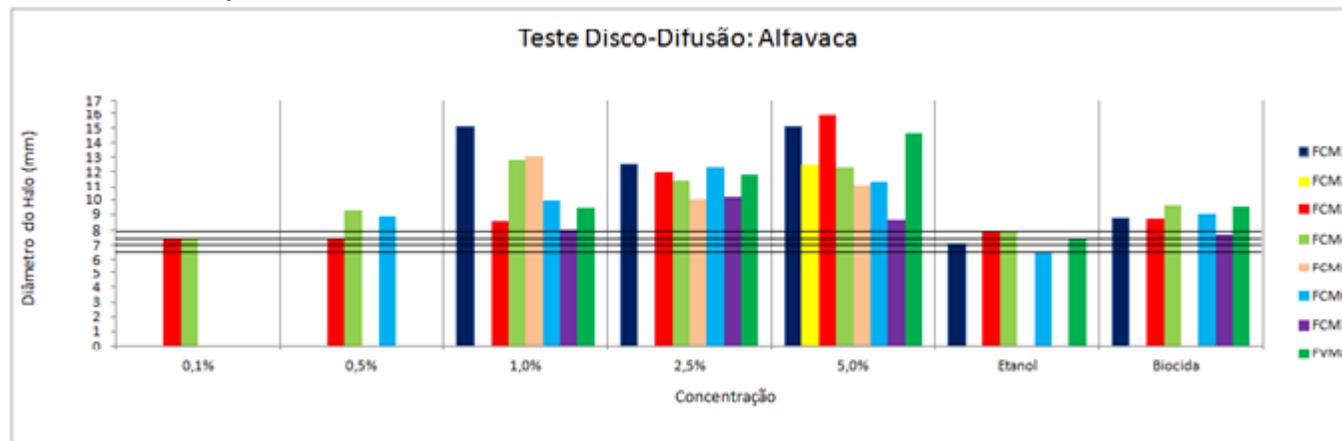
Nas Figuras 13 e 14 pode-se visualizar os resultados do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem vegetal.



Nota: As linhas horizontais traçadas indicam o tamanho do halo formado pelo etanol.

**Figura 11: Gráfico do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem mineral utilizando o óleo essencial de cravo-da-índia**

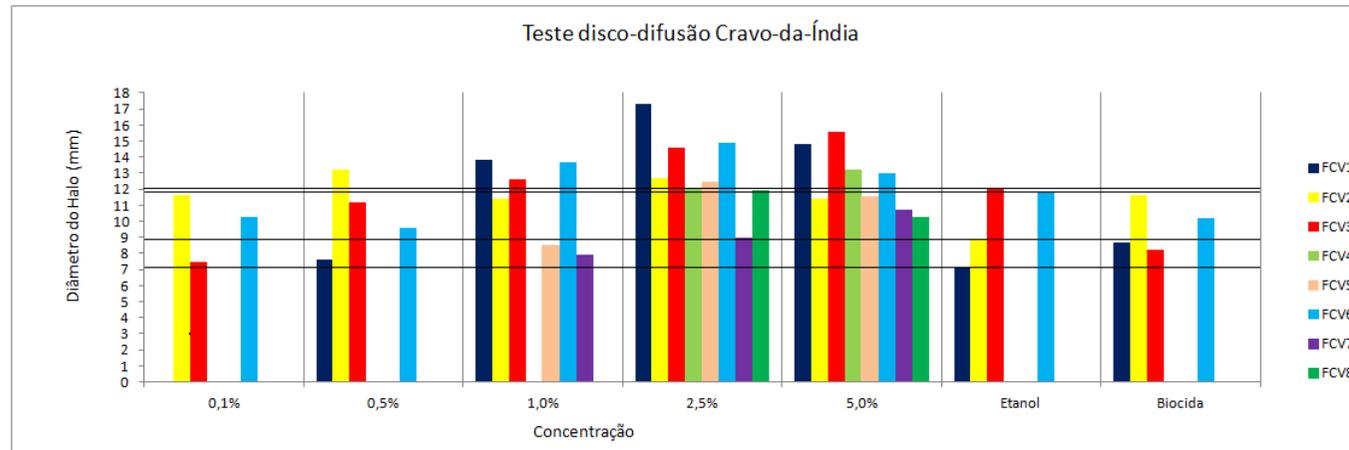
Fonte: Autoria Própria



Nota: As linhas horizontais traçadas indicam o tamanho do halo formado pelo etanol.

**Figura 12: Gráfico do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem mineral utilizando o óleo essencial de alfavaca**

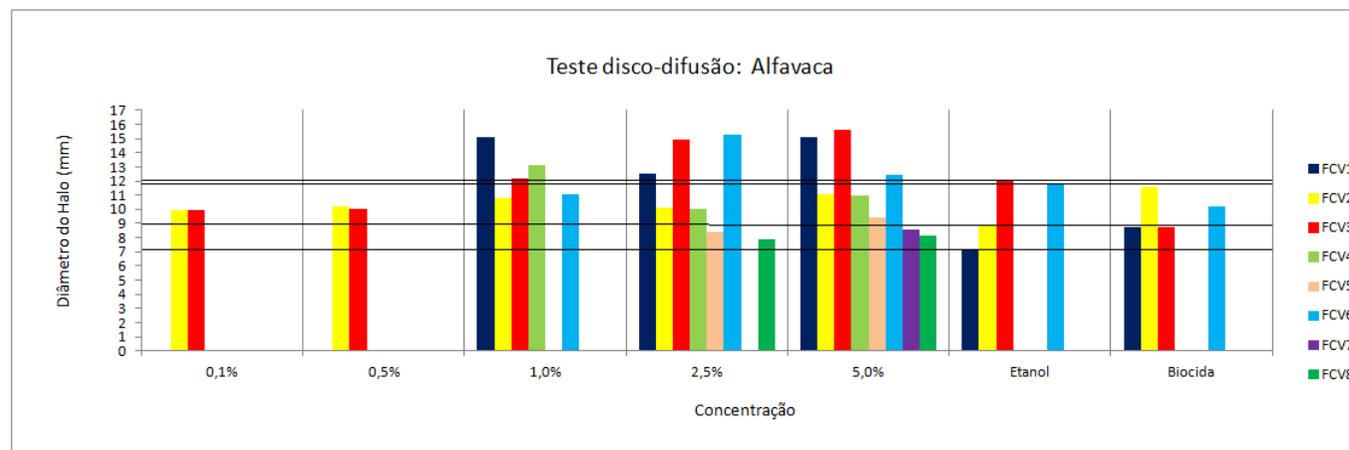
Fonte: Autoria Própria



Nota: As linhas horizontais traçadas indicam o tamanho do halo formado pelo etanol.

**Figura 13: Gráfico do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem vegetal utilizando o óleo essencial de cravo-da-índia**

Fonte: Autoria Própria



Nota: As linhas horizontais traçadas indicam o tamanho do halo formado pelo etanol.

**Figura 14: Gráfico do teste de disco-difusão com isolados bacterianos de fluido de corte de origem vegetal utilizando o óleo essencial de alfavaca**

Fonte: Autoria Própria

Os halos dos isolados (quando formados) pelo cravo-da-índia (Figuras 11 e 13) variaram entre 9 e 16 mm, para os de fluido de corte mineral e de 7 a 17 em fluido de corte vegetal.

Pereira et al (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do mesmo óleo essencial diluído em etanol, nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0% e obtiveram halos que mediam respectivamente 8, 9, 9 e 9 mm testado em *Escherichia coli* e, 10, 11, 11, e 11 mm em *Staphylococcus aureus*. Santos Junior (2011) também empregou essa metodologia em estudo avaliando a sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, variando a concentração de 0,1 a 50%, a qual resultou na formação de diâmetros de halos que viraram de 7 a 16,33 mm. Estes resultados são interessantes, pois as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, são patógenos encontrados em fluidos de corte (GRUB, 2013, POLITO, 2006).

A partir dos valores observados nas Figuras 11, 12, 13 e 14 foram elaboradas as Tabelas 1 e 2, referentes ao fluido de corte mineral e vegetal, respectivamente, nas quais o x indica que houve inibição de crescimento do isolado pelo agente antimicrobiano.

Tabela 1: Efeito dos biocidas sobre os isolados bacterianos de fluido de corte mineral

Isolado	Cravo-Da-Índia					Alfavaca					Biocida
	0,1%	0,5%	1%	2,5%	5,0%	0,1%	0,5%	1,0%	2,5%	5,0%	1,0%
FCM1	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X
FCM2	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
FCM3	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X
FCM4	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
FCM5	-	-		X	X	-	-	X	X	X	-
FCM6	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
FCM7	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X
FCM8	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X

Nota: X-Inibição e – sem inibição.

Fonte: Autoria própria

Observando a Tabela 1, nota-se que o biocida a 1% inibiu o crescimento de 6 isolados, sendo que, o óleo essencial de alfavaca inibiu 7 na mesma concentração, indicando ser mais eficiente nas condições testadas.

Apesar do óleo essencial de cravo-da-índia inibir o mesmo número de isolados que o biocida (na mesma concentração), apresentou diâmetros de halos de inibição maiores, indicando ser também mais eficiente que o biocida sintético na mesma concentração.

Além disso, é possível afirmar que o etanol não influenciou na inibição dos isolados bacterianos FCM1, FCM5 e FCM7, pois não ocorreu a formação de halos (Figuras 11 e 12).

Tabela 2: Efeito dos biocidas sobre os isolados bacterianos de fluido de corte vegetal

Isolado	Cravo-Da-Índia					Alfavaca					Biocida
	0,1%	0,5%	1%	2,5%	5,0%	0,1%	0,5%	1%	2,5%	5,0%	1,0%
FCV1	-	X	X	x	X	-	-	X	x	X	X
FCV2	-	X	X	x	X	x	X	X	x	X	X
FCV3	-	-	X	x	X	-	-	X	x	X	-
FCV4	-	-	-	x	X	-	-	X	x	X	-
FCV5	-	-	X	x	X	-	-	-	x	X	-
FCV6	-	-	X	x	x	-	-	-	x	X	-
FCV7	-	-	X	x	x	-	-	-	-	X	-
FCV8	-	-	-	x	x	-	-	-	x	X	-

Nota: X-Inibição e - sem inibição.

Fonte: Aatoria própria

Observando as Figuras 13 e 14 é possível perceber que as bactérias do fluido de corte com óleo vegetal foram mais resistentes ao etanol do que as isoladas do fluido com óleo mineral, pois das 8 analisadas, 4 não foram inibidas

Já pela Tabela 2, nota-se que as bactérias foram mais resistentes também em relação ao biocida, pois apenas em 2 ocorreu a formação e halos a 1%.

O óleo essencial de alfavaca a 1% apresentou resultado superior ao biocida, pois na mesma concentração inibiu 4 isolados. O óleo essencial de cravo-da-índia foi ainda melhor, inibindo o crescimento de 6 das 8 bactérias isoladas deste fluido.

Os resultados para as concentrações, 2,5 e 5% foram satisfatórios, tanto para o cravo-da-índia quanto alfavaca (em ambos os fluidos), sendo que, quase todos os isolados bacterianos do foram inibidos.

Entretanto, levando em consideração os resultados encontrados na concentração de 1% e ser esta a recomendada pelo fabricante do biocida sintético (proporção que não causa prejuízos para o sistema de usinagem) realizou-se os testes de tempo de contato utilizando esta concentração.

### 5.3 TESTE DE TEMPO DE CONTATO DOS ISOLADOS BACTERIANOS COM BIOCIDAS NATURAL E SINTÉTICO

Depois da realização das análises de tempo de contato das bactérias com os biocidas, foram obtidos dois tipos diferentes de resultados:

- Inibição: quando não foi observado formação de colônia dos isolados bacterianos nos tempos pré-determinados (Figura 15 A);
- Não houve inibição, quando foi observado formação de colônia do isolado no tempo analisado (Figura 15 B-C).

Na Figura 11 são apresentados os dois resultados.

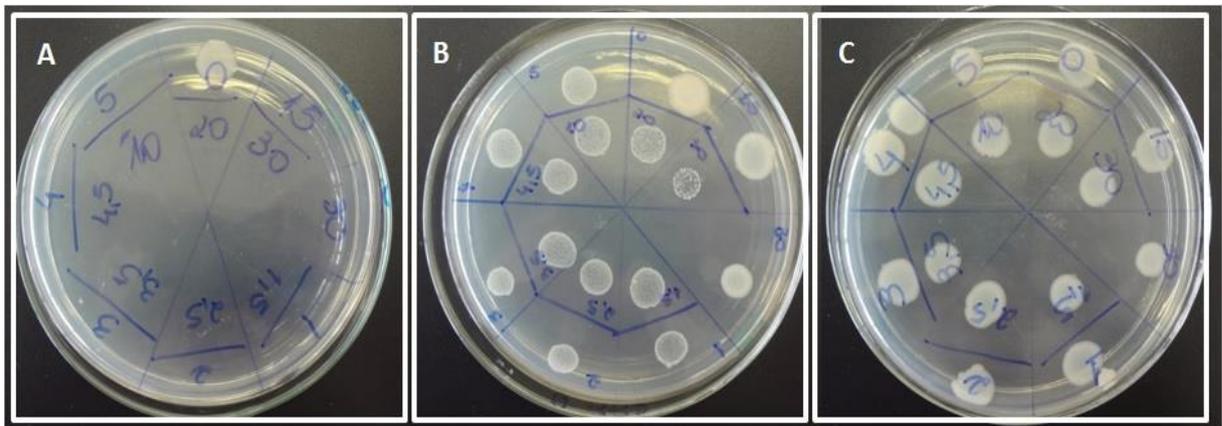


Figura 15: Dois tipos de resultados obtidos nas análises de tempo de contato das bactérias com os biocidas. A- Inibição. B-C não houve inibição

Os resultados obtidos para 8 as bactérias isoladas de fluido de corte com óleo mineral são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Tempo de ação dos óleos essenciais e do biocida para inibição dos isolados bacterianos do fluido de corte mineral

Isolado bacteriano	Cravo-da-Índia	Alfavaca	Biocida
FCM1	0,25'	2'	NI*

FCM2	20'	30'	3,5'
FCM3	10'	NI*	4,5'
FCM4	10'	30'	2,5
FCM5	0,25'	2,5'	NI*
FCM6	0,25'	30'	30'
FCM7	0,25'	NI*	3,5'
FCM8	10'	NI*	NI*

\* NI: Não houve inibição do crescimento bacteriano no tempo analisado

**Fonte: Autoria Própria**

Ao observar os dados contidos na Tabela 3, pode-se constatar que 4 isolados bacterianos foram inibidos pelo óleo essencial de Cravo-Da-Índia em 15 segundos, 3 isolados que foram inibidos em 10 minutos e 1 em 20 minutos.

Percebe-se também, que 1 isolado foi inibido pelo óleo essencial de Alfavaca em 2 minutos, 3 isolados foram inibidos em 30 minutos e em 3 isolados não houve inibição do crescimento bacteriano.

Já o biocida na Tabela 3, nota-se que em 3 isolados não houve inibição do crescimento bacteriano, 2 isolados foram inibidos em 3,5 minutos, 1 isolado sofreu inibição em 4,5 minutos e 1 isolado foi inibido em 30 minutos.

Destas análises pode-se afirmar que, de modo geral, o óleo essencial que possui o tempo de ação mais rápido, para esses 8 isolados bacterianos provenientes de fluido de corte mineral, foi o cravo-da-índia, superando também a eficiência do biocida sintético.

Na Tabela 4 é exposto o tempo de ação dos óleos essenciais e do biocida para inibição dos isolados bacterianos de fluido de corte vegetal.

Tabela 4: Tempo de ação dos óleos essenciais e do biocida para inibição dos isolados bacterianos do fluido de corte vegetal

<b>Isolado Bacteriano</b>	<b>Cravo-da-Índia</b>	<b>Alfavaca</b>	<b>Biocida</b>
FCV1	4,5'	20'	NI*
FCV2	NI*	NI*	NI*
FCV3	NI*	NI*	10'

FCV4	5,0'	NI*	NI*
FCV5	1,5'	10'	20'
FCV6	NI*	NI*	30'
FCV7	20'	NI*	NI*
FCV8	1,5'	20'	NI*

\*NI: Houve redução, mas não houve inibição do crescimento bacteriano no tempo analisado

**Fonte: A autoria própria**

Pode-se verificar a partir dos dados na Tabela 4 que dos isolados bacterianos em relação ao óleo essencial de cravo-da-Índia: 1 sofreu inibição em 4,5 minutos, em 3 não houve inibição do crescimento no tempo analisado, 1 foi inibido em 5 minutos, 2 foram inibidos em 1,5 minutos e 1 em 20 minutos

A análise de tempo de ação utilizando alfavaca (Tabela 4), mostrou que dos 8 isolados bacterianos selecionados do fluido de corte vegetal: 2 foram inibidos em 20 minutos, em 5 não houve inibição do crescimento bacteriano no tempo analisado e 1 foi em 10 minutos.

Ainda na Tabela 4, têm-se os dados do biocida que, dos isolados bacterianos: 5 não sofreram inibição do crescimento bacteriano no tempo analisado, 1 foi inibido em 10 minutos, 1 foi inibido em 20 minutos e 1 foi inibido após 30 minutos.

Para estes isolados, pode-se afirmar que resultados com óleo essencial de Cravo-Da-Índia foram melhores, quando comparados à alfavaca e ao biocida, pois o tempo de ação de inibição foi mais curto, considerando o tempo analisado.

Em estudo com óleo essencial de cravo-da-índia e alfavaca, Almeida et al. (2014) avaliaram o tempo de exposição dos óleos sobre *Staphylococcus aureus* e constataram que óleo de cravo-da-índia apresentou maior atividade antimicrobiana do que alfavaca nos intervalos de tempos analisados.

Oliveira (2011b) obteve resultado análogo quando analisou os mesmos óleos essenciais em isolados bacterianos, concluindo que o cravo-da-índia obteve melhores resultados do que a alfavaca tanto no quesito inibição, quanto no tempo em que isso ocorreu.

Esses resultados eram esperados, pois o eugenol (princípio ativo com propriedades bactericidas) é mais abundante no cravo-da-índia, cerca de 80 % contra 70% da alfavaca (SHERER et al.,2009; LORENZI e MATOS, 2002).

## 6 CONCLUSÃO

Foi observado que os 16 isolados bacterianos dos fluidos de corte mineral e vegetal foram identificados, na sua maior parte, cocos de parede celular Gram positiva.

É possível concluir que os óleos essenciais na mesma concentração (1%) recomendada pelo fabricante para biocidas sintéticos, apresentaram melhores resultados na inibição dos isolados bacterianos dos dois tipos de fluido de corte, tanto com óleo mineral quanto com óleo vegetal.

Conclui-se também, que o tempo para inibição dos isolados bacterianos foi mais rápido para os óleos essenciais do que o biocida sintético analisado.

O tempo de inibição, quando ocorreu, pelos biocidas foi mais rápido nos isolados bacterianos de fluido de corte mineral do que nos de fluido vegetal.

Apesar do óleo essencial de alfavaca inibir mais isolados bacterianos de fluido de corte mineral do que o cravo-da-índia, este foi o que apresentou melhor eficiência, considerando que produziu os maiores diâmetros de halos de inibição e inibição mais rápida.

## 7 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se para trabalhos futuros a utilização de óleos essenciais com diferentes princípios ativos, observar a eficiência da combinação entre eles, e a utilização de outros solventes a fim encontrar resultados ainda melhores.

Além disso, recomenda-se avaliar se é economicamente viável a substituição do biocida sintético pelo óleo essencial, e também, como seria o desempenho das máquinas de fresamento com esse novo componente.

## REFERÊNCIAS

ABIQUIM. **Famílias e produtos químicos utilizados no tratamento de águas: Biocidas**. Disponível em: <[www.abiquim.org.br/comissao/setorial/saneamento-e-tratamento-de-agua/especificidade/curiosidade](http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/saneamento-e-tratamento-de-agua/especificidade/curiosidade)>. Acesso em: 20 fev. 2015.

AFFONSO, R. D.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo-da-índia. **Revista Virtual Química**. Rio de Janeiro, v. 4, n. 2. p. 146-161, maio 2012.

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**, Rio de Janeiro- RJ, v. 20, n. 4, p.248-251, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 02/2007**: Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Brasília/DF: Imprensa Nacional, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S; AVERBECK, D. IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: A review. **Food And Chemical Toxicology**, Estados Unidos, v. 46, n. 2, p.446-475, fev. 2008

BENNET, E.O., The biology of metalworking fluids, **Journal of the American society of lubrication engineers**, Houston, Texas, ano 6, v 28, p 237-247, 1972

BIANCHI, E. C.; ARRUDA, O. S.; PIUBELI, F. A.; AGUIAR, P. R.; ARRUDA, M. S. P. **Controle do crescimento microbiano nos fluido de corte utilizando a radiação ultravioleta**, CIMM - Centro de Informação Metal Mecânica, Portal CIMM, p. 1 - 16, 18 abril. 2008.

BRASIL. Secretaria do Desenvolvimento da Produção. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Desenvolvimento da Produção: Metalurgia e Siderurgia**. 2012. Colaboração: Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=3257>>. Acesso em: 10 maio 2015

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. **International Journal of Food Microbiology**. n. 94, p. 233-253, 2004.

CAPELLETTI, R.. **AValiação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CARVALHO, I. T. de. **Microbiologia Básica**. Recife: EDUFRPE, 2010. 108 p.

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**. 53<sup>o</sup>: Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, 2013.

CENTRO DE INFORMAÇÃO METAL MECÂNICA (CIMM). **Contaminação de óleo de corte: um problema crônico**. 2009a Disponível em: <[http://www.cimm.com.br/portal/noticia/exibir\\_noticia/5148-contaminacao-de-oleo-de-corte-um-problema-cronico](http://www.cimm.com.br/portal/noticia/exibir_noticia/5148-contaminacao-de-oleo-de-corte-um-problema-cronico)> .Acessado em 20 de fevereiro de 2015.

CENTRO DE INFORMAÇÃO METAL MECÂNICA (CIMM). **Aplicação e Utilização dos fluido de corte no processo de retificação**. 2009b. Disponível em: <[http://www.cimm.com.br/portal/noticia/exibir\\_noticia/5696-aplicacao-e-utilizacao-dos-fluidos-de-corte-nos-processos-de-retificacao](http://www.cimm.com.br/portal/noticia/exibir_noticia/5696-aplicacao-e-utilizacao-dos-fluidos-de-corte-nos-processos-de-retificacao)>. Acessado 09 de fevereiro de 2015.

CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA LIMPA (CNTL/SENAI/RS). **Projeto programa piloto para a minimização dos Impactos gerados por resíduos perigosos. Documento 3– Gestão de resíduos s de usinagem** 2006. Disponível em: <[http://wwwapp.sistemafiergs.org.br/portal/page/portal/sfiergs\\_senai\\_uos/senairs\\_uo697/proximos\\_cursos/Fluidos%20de%20usinagem\\_RS.pdf](http://wwwapp.sistemafiergs.org.br/portal/page/portal/sfiergs_senai_uos/senairs_uo697/proximos_cursos/Fluidos%20de%20usinagem_RS.pdf)> .Acessado 30 de novembro de 2014.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE METALURGIA (CNM). **Setor Siderúrgico**, 2011. Disponível em: <[http://www.cnmcut.org.br/sgc\\_data/conteudo/%7BF5BE2B4B-0296-4F49-AE27-6E7514DE7F5B%7D\\_siderurgico\\_final.pdf](http://www.cnmcut.org.br/sgc_data/conteudo/%7BF5BE2B4B-0296-4F49-AE27-6E7514DE7F5B%7D_siderurgico_final.pdf)> . Acessado 20 de fevereiro de 2015.

FERREIRA, J. C. **Investigação de Bactérias Patogênicas Provenientes de Esgoto Hospitalar e Sanitário: avaliação do perfil de suscetividade a anti microbianos e agentes químicos.** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina. 2015.

FIGUEIREDO, A. C. BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; J. J. C. SCHEFFER. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal** , v.23, n.4, p. 213 -26, 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL.(FIB) **Agentes microbianos químicos e naturais** São Paulo: Insumos, n. 15, 2010.

GONÇALVES, J. F. S. **Proposição de método de desenvolvimento de fluido de corte de base vegetal.** São José dos Campos: Tese (doutorado) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica,. 2013. 223f.

GRUB, A. M. **Avaliação do desempenho de s fluido de corte contaminados no processo de torneamento de aço inoxidável austenítico V304UF.** Uberlândia. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

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

LIMA, E. G. A. **Longevidade do fluido de usinagem de metais a partir do uso de combinação de aminoálcool de alto peso molecular e etanolaminas.** Dow Química, São Paulo, SP Brasil, 2012.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE,P. J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology, Reino Unido**, v. 91, n. 3, p.453-462, 2001.

LISBOA, F. C.; MORAES, J. J. B.; HIRASHITA, M. **Fluido de corte: Uma abordagem geral e novas tendências.** A. XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

LUFIT, S. L.; SOUZA, J. F.; GOMES, J. O. **Técnicas de assepsia para aumentar a vida útil dos s fluido de corte.** XVII Congresso Nacional de Estudantes de Engenharia Mecânica, 2011.

MILLEZI, A. F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 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.

MOREIRA, M. R.; ROSA, J. B. D.; MARCELINO, L. I. O.; CALADO, C. R.; SILVA, L. R.; LIMA, H.V.; MORAIS, H. L. O. **Análise de degradabilidade do fluido de corte mineral utilizado no processo de usinagem.** 52º Congresso Brasileiro de Química, 2012.

MUNDO DA USINAGEM. **A competitividade das indústrias: Ameaças e Oportunidades**, 2009. Disponível em:  
<http://www.omundodausinagem.com.br/?p=4998> Acessado 18 de fevereiro de 2015.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; GUIMARÃES, L. G. L; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, 2011a.

OLIVEIRA, L de. **Efeito inibitório dos óleos essenciais de alfavacão (*ocimum gratissimum* L.) e cravo-da-índia (*syzygium aromaticum* L.) e do suco de mão (*citrus latifoliatanaka*) frente às bactérias *staphylococcus aureus* e *escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos.** 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias) - Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Monte Carlos, 2011:b.

PEREIRA, M. A. A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica.** Porto Alegre, Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010.

PEREIRA, A. de A.; CARDOSO, M. das G.; ABREU, L. R. de; MORAIS, A. R de; GUIMARÃES, L. G. de L.; SALGADO, P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**.v.32 n.3. maio/junho 2008. Disponível

em : < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000300028&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000300028&script=sci_arttext)> Acesso em: 26 de outubro de 2015.

PERES, F. A. S. **Tratamento de águas de resfriamento com peróxido de hidrogênio**. Rio de Janeiro: Dissertação (mestrado)- Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2006.

PINTO, R. I G. S. **Equipamento de Controle de Contaminação Microbiológica para Fluidos de Corte Solúveis**. Itajaí: Sinapse da Inovação, 2012. Resumo executivo apresentado ao Programa Sinapse da Inovação SC- III. Disponível em: <[http://industrol.com.br/publicacoes/projeto\\_final Equipamento Controle Contaminacao.pdf](http://industrol.com.br/publicacoes/projeto_final Equipamento Controle Contaminacao.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2015.

PIUBELI, F. A.; GOMES, R.; ARRUDA, O.S.; ARRUMA, M. S. P.; BIANCHI, E. C.; SILVA JUNIOR, C. E.; AGUIAR, P. R.; CATAI, R.; E. Caracterização microbiológica de uma emulsão mineral utilizada como fluido de corte no processos de usinagem. **Revista Iberoamericana de Engenharia Mecânica**. Vol 12, n.1 p35-41, 2008.

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

POLITO, D. ; MELLA, E. C.; THOMÉ, R.; BIANCHI, E. C.; AGUIAR, P. R.; **Crescimento de microrganismo nos fluido de corte**. XIII SIMPEP. Bauru, 2006.

QUEISSADA, D.D.; SILVA, F. T.; PAIVA, T.C.B.; Tratamentos integrados de efluente metal-mecânico: precipitação química e biotratamento em reator tipo air-lift. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 16 n. 2, 2011.

RABÊLO, W. F.. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia ( syzygium aromaticum**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís- MA, 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 Agrária**, Londrina-PR, v. 32, n. 4, p.1557-1564, 2011

SANTOS JÚNIOR , A. C. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno** .2011.75 f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 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 Medicinai**s, Botucatu, v. 11, n. 4, p.442-449, 2009.

SILVA, T. C. da; OLIVEIRA, J. R. de; SOUZA, S. J. de O. de. Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. **Revista Crase** Inhumas-GO, v. 01, n. 01, p.1-12, 2011.

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

TAKAHASHI, D.F. Biocidas garantem vida útil ao fluido de corte. **Revista Máquinas e Metais**. Aranda n. 475, p. 164-173, Ago., 2005.

TAKAHASHI, D. F. Nova metodologia para otimizar o biocida em fluido de corte. **Revista Máquinas e Metais**. Aranda n. 536, p. 98-99, Jun., 2012.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE , B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**.10ª Edição.São Paulo: Artmed, 2012.

WITTE, H. **Máquinas Ferramentas**: Elementos básicos de Máquinas e Técnicas de construção, 1990.

WOSKIE, S.R., VIRJI, M.A., HALLOCK, M., SMITH, T.J., HAMMOND, S.K., Summary of the Findings from the Exposure Assessments for Metalworking fluid Mortality and Morbidity Studies, **Applied Occupational and Environmental Hygiene**. n 18: p.855-864, 2003.

