

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
CÂMPUS APUCARANA/LONDRINA**

**DANIELLE HIROMI NAKAGAWA**

**INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO PRESENTE EM FLUIDO  
DE CORTE POR BACTÉRIAS E FUNGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LONDRINA  
2015**

**DANIELLE HIROMI NAKAGAWA**

**INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO PRESENTE EM FLUIDO  
DE CORTE POR BACTÉRIAS E FUNGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana e Londrina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Janaina Fracaro de Souza Gonçalves

**LONDRINA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação UTFPR - Câmpus Londrina

N163i Nakagawa, Danielle Hiromi

Investigação da degradação do óleo presente em fluido de corte por bactérias e fungos / Danielle Hiromi Nakagawa - Londrina: [s.n.], 2015.  
39 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia Valéria Marques Cardoso Prates  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Fracaro de Souza Gonçalves  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2015.  
Bibliografia: f. 36-39

1. Fluidos de Corte. 2. Óleo vegetal. 3. Óleo mineral. 4. Contaminação microbológica. I. Prates, Kátia Valéria Marques Cardoso, orient. II. Gonçalves, Janaina Fracaro de Souza, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 671

Bibliotecária: Sandra Gomes de Oliveira Reis CRB 9/1287 – DIRPPG-LD



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
Campus Apucarana/Londrina



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

# **INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO PRESENTE EM FLUIDO DE CORTE POR BACTÉRIAS E FUNGOS**

por

**Danielle Hiromi Nakagawa**

Dissertação de Mestrado apresentada no dia oito de dezembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates - Orientador  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Isabel Craveiro Moreira Andrei - Membro Titular  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Fontes de Oliveira - Membro Titular  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Fontes de Oliveira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me guiou em todos os momentos da vida e sempre esteve presente mostrando sua infinita magnitude.

A toda a minha família, em especial aos meus pais Milton e Elizabeti e minha irmã Julliany, por todo o apoio e carinho.

Ao companheiro que escolhi para a vida toda, Luís, que me deu apoio, carinho e amor em todas as minhas escolhas e que juntos estamos conquistando os nossos sonhos.

A orientadora e amiga Prof. Kátia, que é um exemplo de profissional em quem me espelho. Agradeço pela confiança, pela oportunidade e por todos os ensinamentos que levarei comigo a vida toda.

As professoras Janaína e Isabel por terem compartilhado todo o conhecimento e terem contribuído imensamente para a realização deste trabalho.

Ao Fábio, que foi companheiro deste trabalho e que sempre me ajudou em todos os momentos necessários.

Ao professor Janksyn pela contribuição no trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, em especial a Laura, Ana Alícia, Gabriela e Francielly que foram companheiras e amigas em todos os momentos e que me ajudaram a completar com êxito esta etapa da vida.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram e estiveram presentes nessa jornada.

## EPÍGRAFE

Pense positivo e acredite, porque  
assim é e assim será!  
(A Mensageira)

## RESUMO

NAKAGAWA, Danielle Hiromi. **Investigação da degradação do óleo presente em fluido de corte por bactérias e fungos**. 2015. 39 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

O fluido de corte é largamente utilizado no processo de usinagem de metais, porém é vulnerável à contaminação microbiológica que contribuem para sua perda de qualidade fazendo com que diminua o seu tempo de vida útil. Tendo em vista que diversos trabalhos estudam a contaminação microbiológica do fluido, mas poucos relacionam com as alterações químicas do óleo constituinte do fluido, o objetivo do presente trabalho foi monitorar o crescimento de microrganismos em duas bases de fluidos de corte cada um contendo um tipo de óleo (mineral e vegetal) sob duas condições de funcionamento de máquina ferramenta: processo normal e processo utilizando um catalisador eletrofísico que direcionava fluxo de ozônio no fluido de corte, avaliar as mudanças químicas do óleo extraído do fluido e a capacidade dos microrganismos isolados de degradar o fluido de corte e o óleo extraído. Foram realizados contagem e isolamento de bactérias e fungos no fluido de corte utilizado na máquina ferramenta ao longo de 166 horas de utilização da máquina. Para a análise da qualidade do óleo, este foi extraído do fluido de corte e posteriormente medidos o índice de acidez (óleo mineral e vegetal), iodo e saponificação do óleo vegetal. Para o teste de degradação de hidrocarbonetos foi utilizado o 2,6-diclorofenol-indofenol como indicador de degradação, sendo as fontes de carbono: fluido de corte e os óleos extraído do fluido de corte em diferentes tempos de uso da máquina. Os resultados demonstraram que no fluido de corte mineral operado na máquina por 126 horas a quantidade de bactérias e fungos foi na ordem de  $10^5$  e  $10^2$  UFC/mL, respectivamente, com a utilização do catalisador (em 40 horas de operação da máquina) foi para  $10^6$  e  $10^1$  UFC/mL. No fluido de corte vegetal os valores foram de  $10^2$  UFC/mL para bactérias e fungos e após a aplicação do catalisador as quantidades foram para  $10^5$  e  $10^3$  UFC/mL, respectivamente. Dos microrganismos isolados do fluido de corte mineral que foram avaliados quanto a degradação de hidrocarbonetos, verificou-se que 42% das bactérias e 84% dos fungos foram capazes de degradar o fluido de corte ou o óleo em 5 dias de análise. Enquanto 54% das bactérias e 74% dos fungos do fluido de corte vegetal foram capazes de degradar o fluido de corte ou o óleo. Pode-se concluir que houve alterações químicas no óleo utilizado no fluido de corte e que os microrganismos podem ter influenciado diretamente na degradação do óleo, pois o aumento da quantidade de microrganismos acompanhou a degradação do óleo.

**Palavras-chave:** óleo vegetal; óleo mineral; ozônio, contaminação microbiológica.

## ABSTRACT

NAKAGAWA, Danielle Hiromi. **Investigation of oil degradation present in cutting fluid by bacteria and fungi**. 2015. 39 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

The cutting fluid is widely used in metal machining process, but it is vulnerable to microbiological contamination contributing to loss in quality causing the decrease of its useful lifetime. Considering that many papers study the microbiological contamination of the fluid, but few associated to chemical changes of the oil constituent of the fluid, the objective of this study was to monitor the growth of microorganisms in two cutting fluids bases each containing a type of oil (mineral and vegetable) under two operating conditions of the machine tool: normal process and process using a electrophysical catalyst which directs the flow of ozone to the cutting fluid, to evaluate the chemical changes of the fluid oil extracted and the capability of microorganisms to degrade the cutting fluid and the oil extracted. Counting and isolation of bacteria and fungi were performed on cutting fluids used in machine tool throughout 166 hours of operation of the machine. For analysis of oil quality, it was extracted oil of the cutting fluid and posteriorly it was measured the acidity index (mineral and vegetable oils), iodine and saponification of vegetable oil. For the hydrocarbon degradation test it was used 2,6-dichlorophenol-indophenol as degradation indicator, being carbon sources: cutting fluid and oil extracted from the cutting fluid at different times of use of the machine. The results demonstrated that the amount of bacteria and fungi present in the mineral cutting fluid operated on the machine for 126 hours was in the order of  $10^5$  to  $10^2$  CFU/ml, respectively, and using the catalyst (40 hours of machine operation) it was  $10^6$  and  $10^1$  CFU/mL, respectively. The amount of bacteria and fungi from vegetable cutting fluid were  $10^2$  CFU/ml and after the application of the catalyst they were  $10^5$  and  $10^3$  CFU/ml, respectively. In the degradation tests of hydrocarbon, it was found that 42% of bacteria and 84% of the fungi were able to degrade the mineral cutting fluid or extracted oil on 5 days of analysis. 54% of bacteria and 74% of the fungi found on vegetable cutting fluid were able to degrade the cutting fluid or extracted oil. It can be concluded that there were chemical changes in the oils used to prepare cutting fluid and that microorganisms can be directly influenced in oil degradation, since the increased amount of microorganisms followed the oil degradation.

**Keywords:** vegetable oil; mineral oil; ozone; microbiological contamination.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Máquina ferramenta. (A) Visão frontal do equipamento; (B) Detalhe da liberação do fluido de corte, e (C) Detalhe do reservatório de fluido de corte.....	12
Figura 2 - Aparato utilizado para a desinfecção do fluido de corte.....	14
Figura 3 - Representação esquemática da separação do óleo do fluido de corte.....	16
Figura 4 - Representação esquemática da contagem e isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos da amostra de fluido de corte.....	18
Figura 5- Representação esquemática da (A) distribuição das amostras e controles na placa de ELISA e (B) visualização dos resultados ao longo do tempo de análise. ...	20
Figura 6 - Alteração da coloração do óleo mineral e vegetal separado do fluido de corte ao longo das coletas realizadas. ....	21
Figura 7 - Valores de IA do óleo mineral separado do FCM e valores de IA, II e IS do óleo vegetal separado do FCV.....	22
Figura 8 - Quantidade de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos no FCM e FCV e seus respectivos desvios padrão (Desv. Pad.) ao longo do estudo com o processo normal e com o processo de desinfecção (catalisador eletrofísico).....	26
Figura 9 - Capacidade de degradação das fontes de carbono analisadas em 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5d e quando não apresentou degradação foi representado como ND. (A) Isolados de bactérias do FCM; (B) Isolados de fungos do FCM; (C) Isolados de bactérias do FCV; (D) Isolados de fungos do FCV.....	32

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
2.1 PROCESSOS DE USINAGEM.....	12
2.2 LIMPEZA E INSERÇÃO DO FLUIDO DE CORTE NA MÁQUINA FERRAMENTA .....	13
2.3 OPERAÇÃO DA MÁQUINA .....	14
2.4 COLETA DE AMOSTRA .....	15
2.5 SEPARAÇÃO DO ÓLEO DO FLUIDO DE CORTE.....	15
2.6 ANÁLISES QUÍMICAS DO ÓLEO.....	16
2.7 ANÁLISES FÍSICOS E QUÍMICOS DO FLUIDO DE CORTE .....	16
2.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO FLUIDO DE CORTE.....	17
2.8.1 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos.....	17
2.8.2 Isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos .....	17
2.8.3 Teste de capacidade de degradação do fluido de corte e dos óleos mineral e vegetal.....	19
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
3.1 ANÁLISES QUÍMICAS DO ÓLEO.....	21
3.2 ANÁLISES FÍSICOS E QUÍMICOS DO FLUIDO DE CORTE .....	24
3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO FLUIDO DE CORTE.....	25
3.3.1 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos.....	25
3.3.2 Isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos .....	29
3.3.3 Teste de capacidade de degradação do fluido de corte e dos óleos mineral e vegetal.....	30
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de um grande número de produtos utilizados no dia a dia da população (vestuário, alimentação, entre outros) está relacionado com corte de metal, podendo ser diretamente no seu processo de fabricação, ou indiretamente, por meio da fabricação de máquinas (ERNST, 1951). Desse modo, o fluido de corte é importante pois é utilizado na usinagem de metais com as funções de diminuir o calor gerado no processo de remoção de metal, reduzir a zona de atrito entre a ferramenta e a peça e remover os cavacos (KOCH et al. 2015).

Os fluidos de corte têm em sua composição óleos, que garantem alto poder lubrificante, podendo assegurar um melhor acabamento superficial à peça. Desse modo, são utilizados dois principais tipos de fluido de corte: os óleos integrais e os óleos emulsionáveis (fluido de corte miscível em água). A escolha do fluido de corte a ser utilizado depende de fatores como: material da peça, condições de usinagem, material da ferramenta e operações de usinagem (DINIZ et al., 1999).

Tipicamente, os fluidos de corte miscíveis em água (no presente estudo, o termo fluido de corte será utilizado para se referir ao fluido de corte miscível em água) são distribuídos na forma de concentrados e são diluídos com água para concentrações de 1 a 10% antes da utilização na máquina de usinagem (DINIZ et al., 1999). O fluido de corte pode ser formulado com aditivos funcionais, para, por exemplo, fornecer capacidade de molhagem, resistência a compressão, inibição de corrosão e formação de espumas (KOCH et al. 2015).

A concentração elevada de água no fluido de corte, bem como a composição química cria um bom habitat para o desenvolvimento de microrganismos, em particular bactérias e fungos. A contaminação microbiana não controlada pode ocasionar a biodeterioração, tanto da máquina de corte quanto do fluido (KOCH et al. 2015).

As consequências da biodeterioração são: alterações na viscosidade do fluido; formação de produtos ácidos oriundos da fermentação, causando corrosão nas peças de metais; produção de compostos químicos orgânicos voláteis (ocasionando odor); queda da eficiência dos aditivos; incrustação de tubulações; diminuição da vida útil da ferramenta de corte e do próprio fluido (BAKALOVA et al., 2007).

Para que uma produção seja eficiente em relação à qualidade do produto, energia despendida e recursos utilizados, é necessário que tenha um desgaste

reduzido da ferramenta e vida útil longa do fluido de corte. Isso só pode ser alcançado se as propriedades técnicas do fluido forem mantidas ao longo do seu uso. Sendo assim, um monitoramento e análise da quantidade de microrganismos presente no fluido de corte é de grande importância (KOCH et al. 2015).

Ao realizar a caracterização dos microrganismos que se reproduzem nos fluidos de corte, pode ser possível encontrar maneiras de minimizar as perdas decorrentes dessa contaminação. O controle dos microrganismos certamente proporcionará economia de recursos da indústria, pois o fluido de corte terá sua vida útil prolongada. Outro fator importante é o aspecto ecológico envolvido, pois com o aumento do tempo de utilização do fluido, faz com que tenha redução do descarte deste produto (PIUBELI et al., 2008).

Diversos trabalhos vêm estudando os microrganismos envolvidos na contaminação do fluido de corte (VAN DER GAST et al., 2003; DILGER et al., 2005; RABENSTEIN et al., 2009; LODDERS; KÄMPFER, 2012; SAHA; DONOFRIO, 2012; TRAFNY, et al. 2015). Porém, poucos estão relacionados com as alterações químicas no óleo constituinte do fluido. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi monitorar o crescimento de microrganismos em duas bases de fluidos de corte cada um contendo um tipo de óleo (vegetal e mineral), avaliando as mudanças químicas dos óleos durante o funcionamento de uma máquina ferramenta, a capacidade das bactérias e fungos isolados do fluido de degradar o fluido de corte e o óleo e verificar a aplicação de um catalisador eletrofísico com fluxo de ozônio na desinfecção do fluido e na degradação do óleo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PROCESSOS DE USINAGEM

No presente estudo foi utilizada uma máquina ferramenta ROMI D-600 Standard (Figura 1), com motor de potência de 15kW e potência total instalada de 30 kVA, faixa de rotação de 7 a 7500 rpm e magazine para 20 ferramentas que utilizam cone ISO 40 para sua fixação no cabeçote. O reservatório do fluido de corte tem capacidade de armazenamento de 300 L. Durante o processo de usinagem, o fluido de corte é impulsionado por uma bomba do reservatório até o local de contato entre a ferramenta e a peça. Posteriormente, o fluido de corte retorna ao reservatório por gravidade.

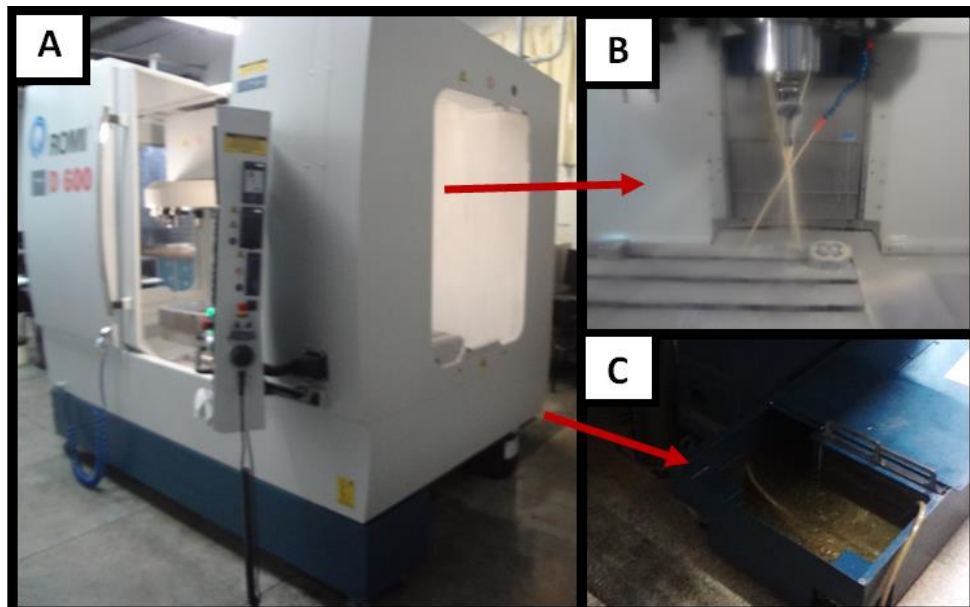


Figura 1 - Máquina ferramenta. (A) Visão frontal do equipamento; (B) Detalhe da liberação do fluido de corte, e (C) Detalhe do reservatório de fluido de corte.

Fonte: Autoria Própria

A máquina operou utilizando dois tipos de fluidos em momentos distintos, um a base de óleo mineral (FCM) e outro a base de óleo vegetal (FCV) de Pinhão-manso (*Jatropha curcas*). As propriedades dos fluidos utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do FCM e FCV.**

<b>Propriedades físico-químicas</b>	<b>FCM (Rocol Ultracut 360°)</b>	<b>FCV (Quakercool 7595)</b>
Estado físico	Líquido	Líquido
Odor	Característico	Característico
Cor visual	Amarelado	Castanho/âmbar a marrom
pH (diluído a 5,0% em H <sub>2</sub> O)	8,5 a 9,9	9,0
Ponto de ebulição	>100°C	240°C
Faixa de destilação	NA	ND
Temperatura de decomposição	NA	240°C
Ponto de fulgor	NA	240°C
Temperatura de autoignição	NA	NA
Limite de explosividade inferior	NA	NA
Limite de explosividade superior	NA	NA
Densidade (a 20/3°C): g/cm <sup>3</sup>	0,950 a 1,033	0,950
Solubilidade	Parcialmente solúvel em hidrocarbonetos alifáticos	Solúvel em éster e gorduras
Solubilidade em água	Solúvel em água	Solúvel em água

**NA: não aplicável**

**ND: Não determinado**

**Fonte: Dados fornecidos pelo fabricante.**

## **2.2 LIMPEZA E INSERÇÃO DO FLUIDO DE CORTE NA MÁQUINA FERRAMENTA**

Antes dos fluidos de corte serem inseridos na máquina, foi realizado um processo de limpeza (asepsia) com biocida na máquina ferramenta. Para tal procedimento, esgotou-se o fluido de corte antigo que estava no sistema e posteriormente foi higienizada a máquina com o biocida comercial (segundo especificações do fabricante). Após a limpeza, foi adicionado a emulsão nova do fluido de corte (conforme instruções do fabricante). Primeiramente foi estudado o FCM por um período de 3 meses e após novo processo de higienização, foi testado o FCV pelo mesmo período de tempo.

## 2.3 OPERAÇÃO DA MÁQUINA

A operação da máquina consistiu na usinagem de ferro fundido nodular (CGG60) e a ferramenta utilizada foi a comercialmente codificada como SPHX 1205 PC TRG PKB – KY3500, sendo esta uma ferramenta específica para usinagem de ferro fundido.

No primeiro momento a máquina ferramenta foi operada normalmente com o fluido de corte, após 126 horas de utilização da máquina foi acoplado um catalisador eletrofísico (sistema de desinfecção) ao reservatório da máquina com o intuito de promover a desinfecção do fluido de corte. Este catalisador eletrofísico, por meio de uma mangueira, direcionava fluxo de ozônio diretamente no reservatório da máquina (Figura 2). O equipamento era acionado por 15 minutos a cada intervalo de 45 minutos, sendo este procedimento realizado ininterruptamente ao longo de 40 horas de funcionamento da máquina.

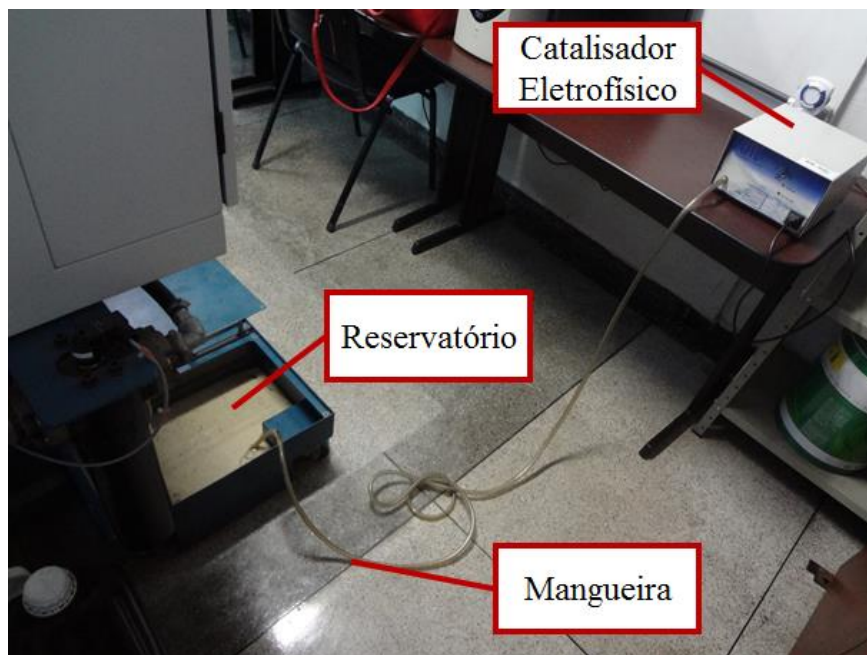


Figura 2 - Aparato utilizado para a desinfecção do fluido de corte.  
Fonte: Autoria Própria

## **2.4 COLETA DE AMOSTRA**

As coletas para as análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas em diferentes horas de uso da máquina. Desse modo, foram coletadas amostras de fluido de corte operados por: 1, 2, 14, 45, 86, 116, 126, 138, 153 e 166 horas de funcionamento da máquina. Para a análise de quantificação de microrganismos no fluido de corte, além dos tempos descritos, foi avaliada a quantidade de microrganismos antes da limpeza da máquina (fluido de corte antigo).

Antes de coletar as amostras o fluido de corte ficava circulando na máquina por 30 minutos a fim de se obter a homogeneização da amostra. Para análise microbiológica a amostra foi coletada do reservatório do centro de usinagem (Figura 1C) de forma asséptica e mantida sob refrigeração inferior a 10°C até o momento da realização das análises. Para as análises químicas do óleo foram coletados 5 litros na mangueira de saída de fluido (Figura 1B).

## **2.5 SEPARAÇÃO DO ÓLEO DO FLUIDO DE CORTE**

Para a extração do óleo utilizado na formulação dos fluidos de corte, primeiramente adicionava-se NaCl para que ocorresse a quebra da emulsão e a separação do óleo. O óleo por ser menos denso que a água fica na parte superior, sendo coletada e transferida para um tubo Falcon. Em seguida, adicionava-se hexano e realizava-se a centrifugação a 1000 rpm para proporcionar a separação de fase. Posteriormente, o hexano era recuperado em rotavapor em banho-maria a 60°C ficando somente o óleo mineral ou vegetal. (Figura 3).



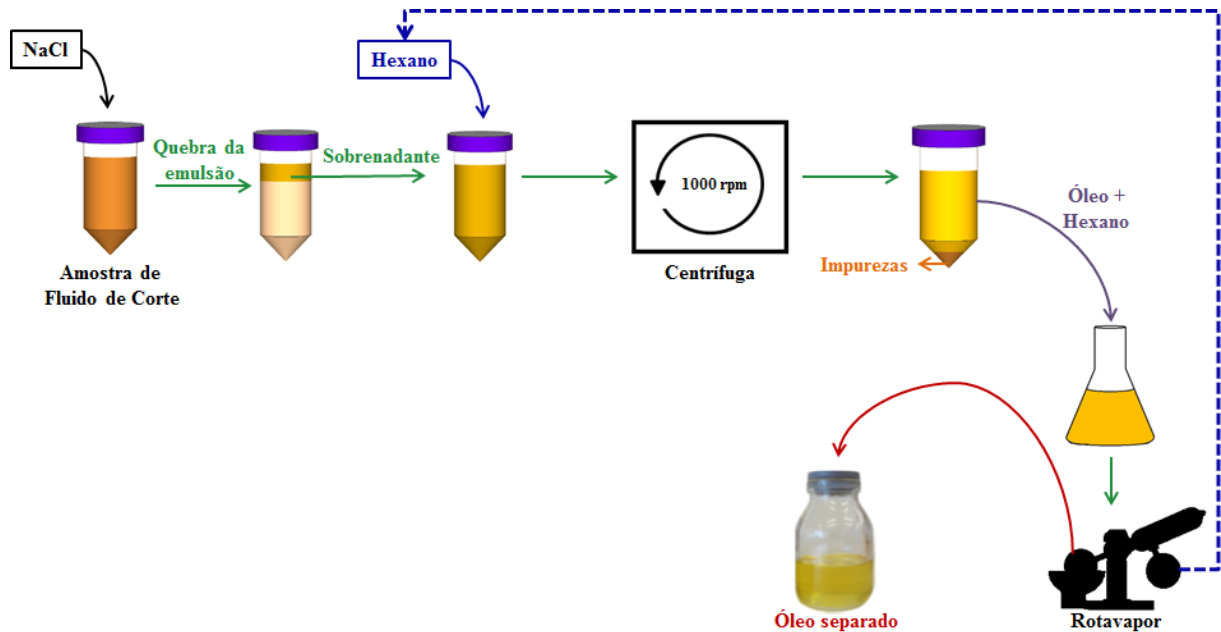


Figura 3 - Representação esquemática da separação do óleo do fluido de corte.  
Fonte: Autoria própria.

## 2.6 ANÁLISES QUÍMICAS DO ÓLEO

Foram realizadas análises químicas no óleo extraído do fluido de corte a fim de avaliar a degradação ao longo do tempo de uso na máquina ferramenta. Foram avaliados o índice de Acidez (IA) para o FCM e FCV e o Índice de Iodo (II) e Saponificação (IS) somente para o FCV, baseados na metodologia descrita por Instituto Adolfo Lutz (2008).

## 2.7 ANÁLISES FÍSICOS E QUÍMICOS DO FLUIDO DE CORTE

Em cada coleta foram avaliados três parâmetros físicos e químicos do fluido de corte: temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e potencial hidrogeniônico (pH). A temperatura e o OD foram estimados utilizando um oxímetro (Politerm: POL-60) durante o momento da coleta da amostra, inserindo o aparelho no reservatório. Para a medição do pH foi coletada uma amostra de 50 mL e então transportada para medição em laboratório utilizando um pHmetro de bancada (MS Tecnopon).

## 2.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO FLUIDO DE CORTE

### 2.8.1 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos

A análise microbiológica do fluido de corte foi realizada a fim de quantificar as bactérias heterotróficas e fungos filamentosos presentes nas amostras. Para o procedimento foi retirada uma alíquota de 10 mL da amostra e adicionou-se 90 mL de solução salina 0,85% obtendo a diluição  $10^{-1}$ . Posteriormente foi realizada a diluição seriada em tubos com 9 mL de solução salina 0,85%, até a diluição  $10^{-3}$ .

A partir da amostra bruta e das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e espalhadas, com auxílio de *Swab*, em placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar - PCA (MERCK - Alemanha) ( $36 \pm 1^\circ\text{C}/24\text{-}48\text{h}$ ) para contagem de bactérias heterotróficas e meio Sabouraud (BD – Estados Unidos da América) ( $28 \pm 1^\circ\text{C}/7$  dias) para contagem de fungos filamentosos. As análises foram realizadas em triplicata.

Após o período de incubação contou-se as colônias desenvolvidas em cada meio de cultura para determinar o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL de fluido de corte.

### 2.8.2 Isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos

Em cada coleta foram isoladas colônias de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos que apresentaram diferentes características coloniais (RODINA, 1972). Para o isolamento de colônias puras de bactérias foi realizada a técnica de esgotamento em placa de Petri contendo meio de cultura PCA ( $24\text{-}48\text{h}/36 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e com o intuito de diferenciar as colônias de bactérias isoladas estas foram submetidas a testes morfotintoriais para avaliar a morfologia e resposta a coloração de Gram (SILVA et al. 2010). Após a obtenção e caracterização das colônias puras de colônias de bactérias, estas foram conservadas e mantidas em meio *Brain Heart Infusion – BHI* (Himedia) com 10% de glicerol em *freezer* a  $-20^\circ\text{C}$ . Para a obtenção de colônias puras

de fungos filamentosos, a colônia do fungo de interesse foi transferida para placa de Petri contendo meio de cultura Sabouraud (7 dias/28±1°C). Após o isolamento da colônia o fungo foi armazenado em água estéril a temperatura ambiente.

A representação esquemática da contagem dos microrganismos e isolamento está detalhado na Figura 4.

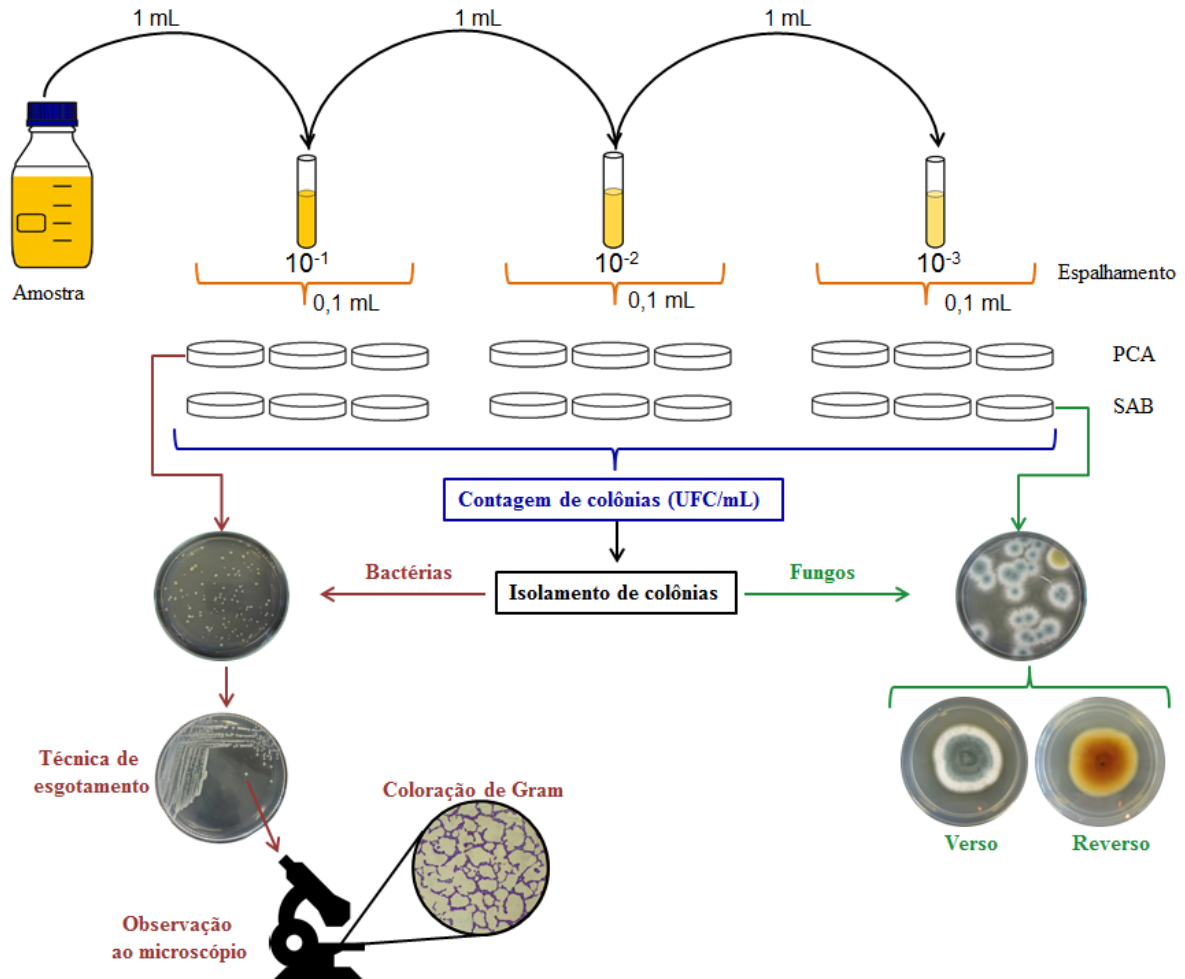


Figura 4 - Representação esquemática da contagem e isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos da amostra de fluido de corte.

Fonte: Autoria própria.

Os microrganismos foram isolados em cada coleta com o objetivo de posteriormente serem analisados quanto a capacidade de degradação de hidrocarbonetos.

### 2.8.3 Teste de capacidade de degradação do fluido de corte e dos óleos mineral e vegetal

A partir dos isolados obtidos foram selecionadas aleatoriamente 50 colônias de bactérias heterotróficas (representando 77% dos isolados do FCM e 91% do FCV) e 50 colônias de fungos filamentosos (68% dos isolados do FCM e 61% do FCV) para serem submetidas ao teste de capacidade de degradação de hidrocarbonetos proposto por Hanson et al (1993, com modificações). A metodologia consiste em inocular o microrganismo de interesse em meio Bushnel Haas (BH) composto por 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L de  $\text{FeCl}_3$  e 0,02g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  com adição de solução de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em concentração 1 g/L juntamente com uma fonte de carbono. Neste estudo foram selecionados quatro tipos fonte de carbono de cada fluido de corte: o fluido de corte mineral ou vegetal e o seu óleo extraído em diferentes tempos de uso da máquina (óleo novo, 126h e 166h).

O DCPIP é um composto químico que altera a coloração de azul escuro para transparente quando reduzido. Desse modo, ao incorporar o DCPIP ao meio de cultura é possível avaliar a capacidade dos microrganismos em utilizar o hidrocarboneto como substrato pela observação da mudança de cor (Bidoia et al., 2010).

Para realização do teste, o inóculo foi padronizado comparando com a turbidez do padrão 0,5 da escala McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) (Miranda et al. 2007) e os fungos padronizados a  $10^7$  conídios/mL utilizando câmara de Neubauer (Maciel et al. 2010). Os testes foram realizados em placas de acrílico (tipo ELISA – *Enzyme* Linked Immuno Sorbent) com 96 poços previamente esterilizados, onde o volume final utilizado foi de 150  $\mu\text{L}$  (8  $\mu\text{L}$  de solução de microrganismos padronizado, 138,6  $\mu\text{L}$  de meio BH, 1,4  $\mu\text{L}$  de DCPIP e 2  $\mu\text{L}$  da fonte de carbono).

Foram feitos dois controles negativos sendo um com 8  $\mu\text{L}$  de água estéril, 138,6  $\mu\text{L}$  de meio BH, 1,4  $\mu\text{L}$  de DCPIP e 2  $\mu\text{L}$  da fonte de carbono (Controle 1, com o objetivo de avaliar se o óleo estaria com presença de microrganismos) e outro com 10  $\mu\text{L}$  de água estéril, 138,6  $\mu\text{L}$  de meio BH, 1,4  $\mu\text{L}$  de DCPIP (Controle 2, para confirmar a esterilidade do meio de cultivo). O teste foi realizado em triplicata. As

placas foram incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  para bactérias e  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  para fungos. A degradação do óleo foi analisada por meio da mudança de coloração de azul para incolor. Foram avaliados diferentes tempos (0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 dias (d)) a fim de averiguar a degradação do óleo (Figura 5).

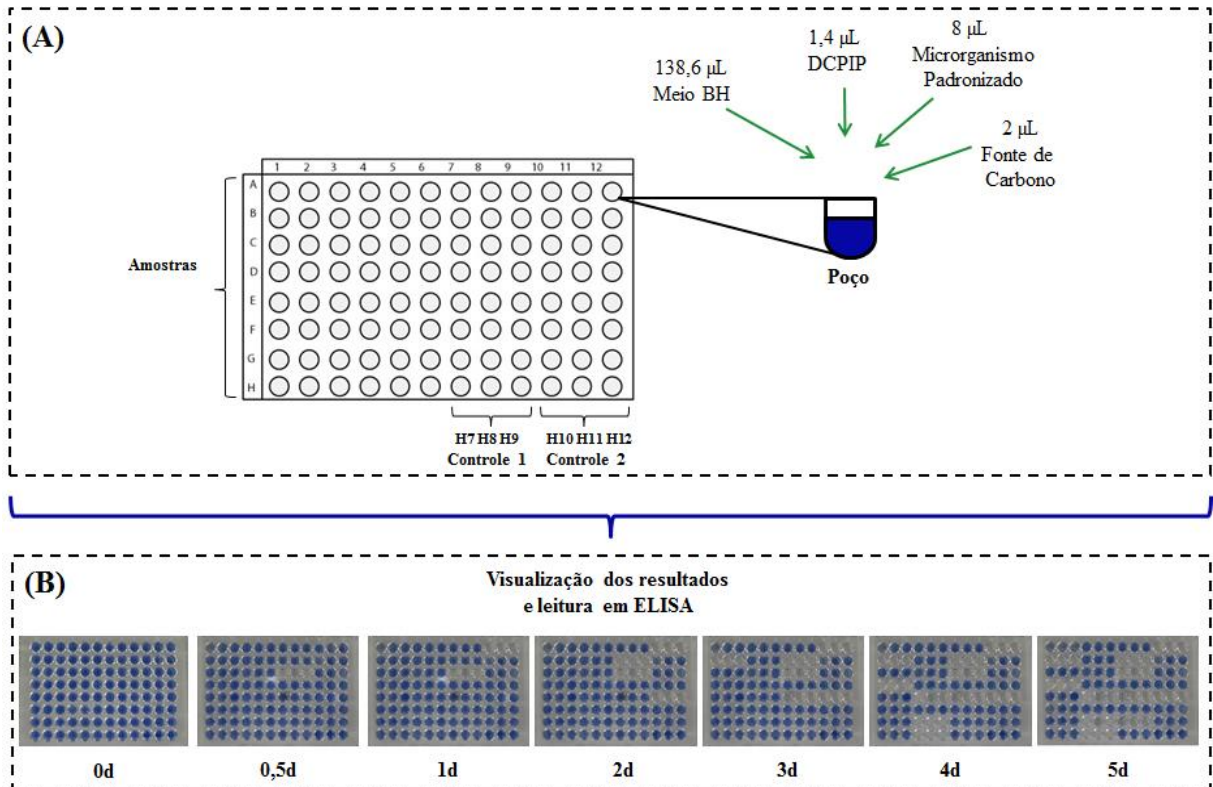


Figura 5 - Representação esquemática da (A) distribuição das amostras e controles na placa de ELISA e (B) visualização dos resultados ao longo do tempo de análise.  
Fonte: Autoria própria.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ANÁLISES QUÍMICAS DO ÓLEO

Ao longo das coletas foi possível observar o escurecimento da cor dos óleos mineral e vegetal (Figura 6), o que pode representar alteração química do óleo em função da alteração da cor.

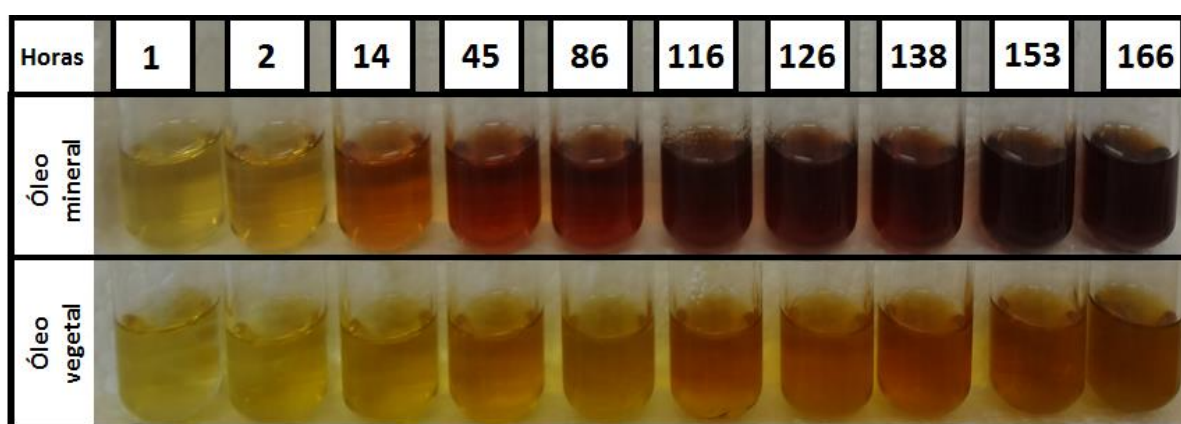


Figura 6 - Alteração da coloração do óleo mineral e vegetal separado do fluido de corte ao longo das coletas realizadas.

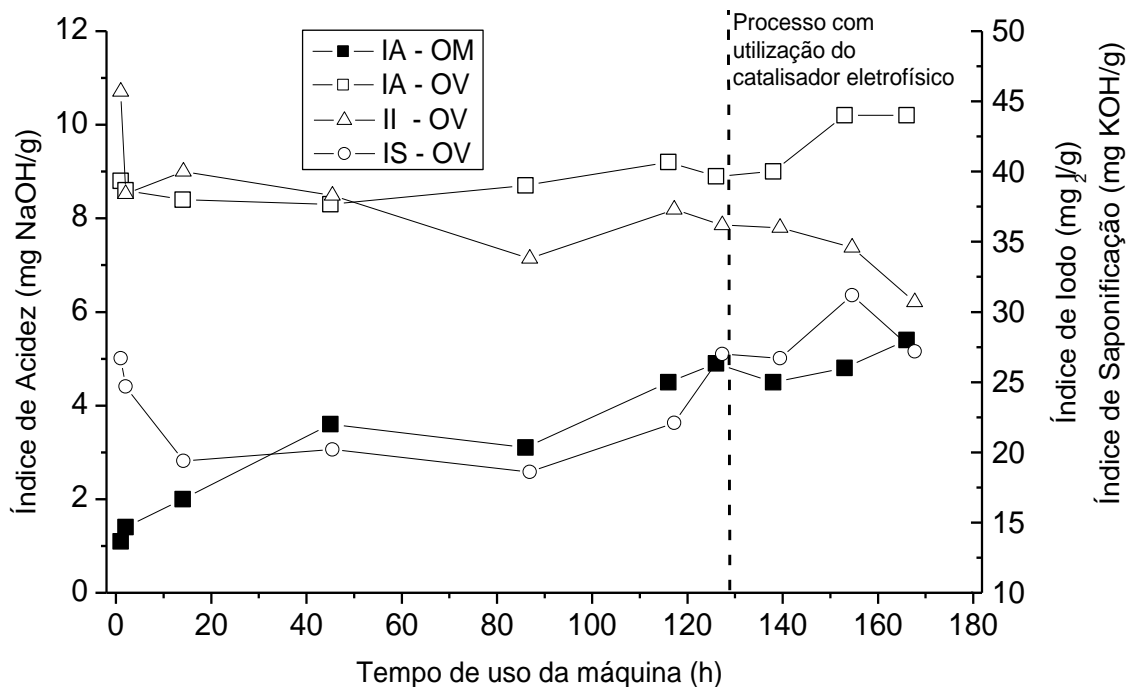
Fonte: Autoria própria.

A cor do óleo vegetal está relacionada com a quantidade de insaturações que nele existem inicialmente, pois quando estes são aquecidos ocorre a isomerização e migração de duplas ligações, levando à conjugação das mesmas. As duplas ligações conjugadas levam à absorção de quantidades maiores de luz azul, provocando um aumento de cores laranja e marrom no óleo (LIMA; GONÇALVES, 1994). Cella et al. (2002) verificaram em seu trabalho que o escurecimento da cor do óleo vegetal analisado está diretamente ligado com a degradação do óleo (IA).

As alterações químicas podem ser evidenciadas nas análises de IA do óleo mineral e IA, II e IS do óleo vegetal ao longo das coletas (Figura 7). O IA do óleo mineral apresentou tendência de aumento ao longo das coletas, assim como o óleo vegetal, indicando aumento de ácidos no óleo, como consequência da degradação.

O II do óleo vegetal está relacionado com a quantidade de dupla ligações presente no óleo, sendo que o valor tendeu a queda, demonstrando que as duplas ligações foram quebradas ao longo do uso do fluido, e conseqüentemente ocorrendo a degradação do óleo. Já o IS apresentou queda no começo das coletas e

posteriormente aumento do valor. Visto que o IS é um índice que representa inversamente o tamanho da cadeia de ácido graxo do óleo vegetal, pode-se supor que no começo do estudo os valores estariam menores pelo fato das cadeias tenderem a ser mais longas e, de fato, com o uso do FCV na máquina, este valor aumentou, o que indica diminuição do tamanho da cadeia por conta da degradação do óleo.



**Figura 7 - Valores de IA do óleo mineral separado do FCM e valores de IA, II e IS do óleo vegetal separado do FCV.**

Fonte: Autoria própria.

A degradação do óleo mineral abrange uma série de fenômenos, tais como reações de oxidação, reações de polimerização, condensação e rupturas de cadeias. Os fatores que mais influenciam a degradação são a presença de oxigênio, temperaturas elevadas e contato com substâncias quimicamente ativas dos materiais. Estes fatores podem ter colaborado para a degradação do óleo mineral do presente trabalho, pois o fluido de corte permaneceu em condições aeróbias ( $OD = 6,5 \text{ mg/L} \pm 0,5$ ) e no contato entre ferramenta-cavaco o fluido de corte pode chegar a altas temperaturas (ZIRBES et al., 2005).

Em temperaturas elevadas o óleo mineral sofre decomposição, onde vários compostos são formados pelo fracionamento dos hidrocarbonetos. Os mecanismos deste processo são complexos, sendo basicamente quebras de ligações carbono-hidrogênio e carbono-carbono, com os radicais livres formados se recombinando formando novos produtos (ZIRBES et al., 2005). Verificando os resultados da Figura

7. é possível observar que no presente trabalho houve aumento do IA, sendo este um indicativo que houve a formação de ácidos ao longo do seu uso.

O aumento do IA no óleo mineral pode ser explicado pelo processo de degradação do óleo, que em geral, se inicia com a formação de radicais livres, que são hidrocarbonetos que perdem um átomo de hidrogênio pela ação catalítica dos metais presentes. A partir dos radicais livres, são formados hidroperóxidos que são produtos instáveis e podem liberar oxigênio. Posteriormente, são formados ácidos e outros produtos polares que são quimicamente ativos. Nesta fase existe um aumento de acidez e do fator de dissipação do óleo (ZIRBES et al., 2005).

Em relação ao IA e II do óleo vegetal é possível verificar que com o aumento da degradação também aumenta o IA, como foi verificado no trabalho de Lima e Gonçalves (1994) que avaliou os IA e II em óleo de soja para fritura de alimentos (140 – 180°C) e verificou que após 44 horas de uso o índice de iodo foi de 131 para 110 mgI<sub>2</sub>/g de óleo e o índice de acidez aumentou de 0,16 para 0,72 mgKOH/g de óleo. Vale ressaltar que no presente trabalho, as condições do óleo são diferentes do processo de fritura, pois o fluido de corte alcança elevadas temperaturas somente na interface ferramenta-cavaco, sendo que no reservatório a temperatura se manteve próximo a 25°C.

O II relaciona-se com quantidade de duplas ligações presente no óleo e a redução observada neste índice se deve à quebra de duplas ligações resultantes de reações de polimerização, ciclização e oxidação (LIMA; GONÇALVES, 1994). No presente trabalho pode se observar a degradação do óleo vegetal pelo II, pois houve queda deste índice ao longo do estudo.

Cella et al. (2002) ao estudar a degradação de óleo vegetal (soja) no processo de fritura de alimentos, verificaram que a presença de água na fritura colabora com o desenvolvimento de reações hidrolíticas, com a produção de ácidos graxos livres, e conseqüentemente, o aumento de acidez no óleo. Este fato pode ter sido um dos motivos para a degradação do óleo vegetal estudado no presente trabalho, visto que o óleo vegetal utilizado no fluido de corte passa por altas temperaturas (maiores que a temperatura de fritura), na interface ferramenta-cavaco, e também há a presença abundante de água.

Segundo Oliveira et al. (2014) os altos IA associados com altos IS no óleo vegetal indicam um elevado grau de oxidação e decomposição das moléculas de triglicerídeos.



E com a utilização do catalisador eletrofísico, todos os índices continuaram indicando degradação do óleo. Em relação ao IA do FCM, verificou-se que antes da utilização do ozônio a taxa de aumento de 0,03 IA/h de uso da máquina e após a utilização do catalisador a taxa foi de 0,01 IA/h de uso da máquina, indicando que o ozônio não influenciou no aumento da produção de ácidos.

Em relação ao IA do FCV verificou-se que antes do uso do catalisador a taxa de aumento era de 0,001 IA/h de uso da máquina e com o processo de desinfecção essa taxa foi para 0,03 IA/h de uso da máquina. Sendo possível verificar que o ozônio pode ter influenciado na formação de ácidos, já que com a sua utilização a taxa de aumento do IA foi maior.

O II sem a utilização do ozônio apresentava uma taxa de queda de 0,076 II/h de uso da máquina, e com a utilização do ozônio foi para 0,14 II/h de uso da máquina, podendo verificar que o ozônio pode ter influenciado na degradação do óleo quebrando as duplas ligações. A taxa de aumento do IS sem a utilização do catalisador era de 0,002 IS/h de uso da máquina e após o processo de desinfecção foi para 0,005 IS/h de uso da máquina. Com o aumento da taxa foi possível verificar que o ozônio pode ter influenciado na degradação do óleo.

### **3.2 ANÁLISES FÍSICOS E QUÍMICOS DO FLUIDO DE CORTE**

As condições ambientais em relação ao, pH, OD e temperatura de ambos os fluidos foram similares (Tabela 2). O pH do fluido de corte, tanto a base de óleo mineral quanto de vegetal, ficou alcalino durante todo o estudo. O pH inicial do FCM e do FCV foi de 9,3 e 9,7, respectivamente. E o valor final foi de 9,1 e 8,7, respectivamente.

Em relação ao OD os dois fluidos estudados apresentaram ambiente aeróbio, acima de 6 mg/L. A temperatura do fluido de corte manteve-se na faixa de 23 a 25°C, sendo possível avaliar que a alta temperatura gerada entre ferramenta e peça durante a usinagem não interfere na temperatura do fluido de corte no reservatório.

**Tabela 2 - Valores médios de pH, oxigênio dissolvido e temperatura do fluido de corte a base de óleo mineral e vegetal.**

Parâmetro	FCM	FCV
pH	9,2 ± 0,1	9,0 ± 0,3
OD (mg/L)	6,5 ± 0,5	6,0 ± 1,2
T (°C)	23,8 ± 0,9	24,2 ± 1,09

No trabalho de Rabeinstein et al. (2009), após 26 semanas de análise do fluido de corte a base mineral, o valor de pH do fluido de corte caiu de 9,2 para 7,3. Já no trabalho de Piubeli et al. (2008) em apenas 7 dias de análise o pH do fluido de corte mineral caiu de 9,4 para 8,4.

O valor de pH do fluido de corte é uma representação da condição do mesmo. Uma diminuição do valor de pH indica queda no desempenho do fluido de corte, tornando-o mais propício ao crescimento microbiano, visto que, geralmente, a contaminação microbiana tende a ser maior em meio ácido, em vez de alcalino (RAO et. al., 2007). Durante o presente estudo os fluidos analisados não apresentaram valores ácidos, porém, foi evidenciado crescimento de microrganismos.

Observou-se que o FCV demonstrou maior queda do pH em comparação com o FCM, porém, ambos os fluidos apresentaram ambiente alcalino ao longo do estudo. O ambiente aeróbio verificado nos fluidos favoreceu o crescimento de microrganismos aeróbios e também a oxidação do óleo do fluido de corte. A temperatura do ambiente foi favorável ao crescimento de microrganismos mesófilos.

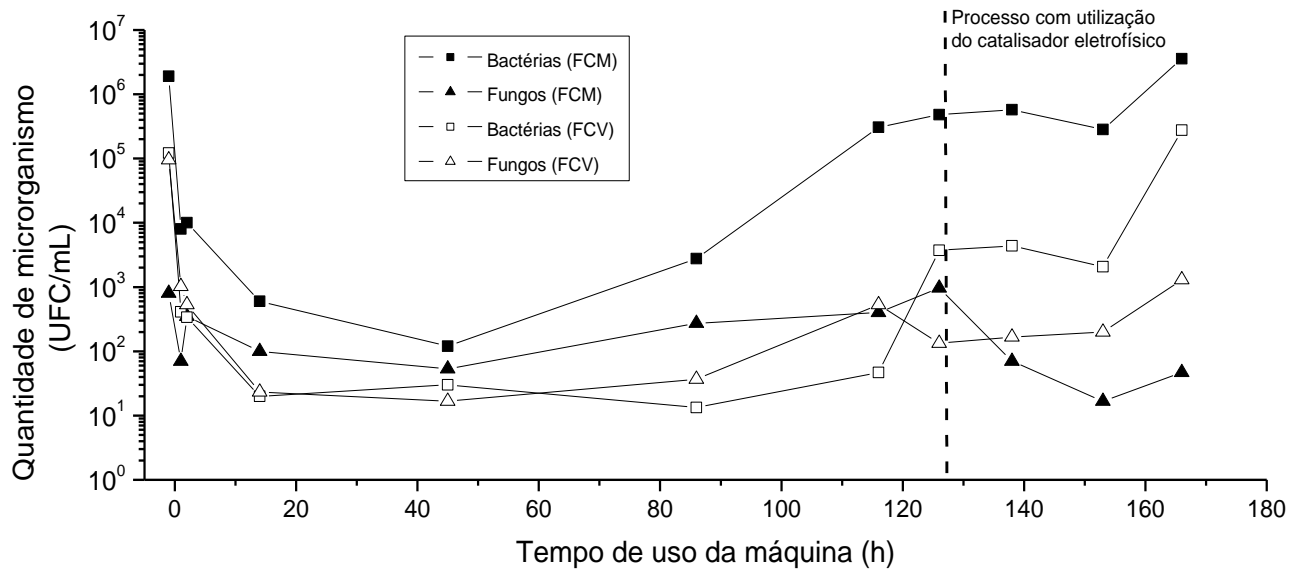
### **3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO FLUIDO DE CORTE**

#### **3.3.1 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos**

As quantidades de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos obtidas pode ser visualizada na Figura 3. O comportamento das curvas de quantidade de microrganismos foi semelhante em ambos os fluidos. O primeiro ponto da curva é referente a quantidade de microrganismos presente no fluido antes de ocorrer o processo de limpeza da máquina. O segundo ponto representa a quantidade de microrganismo presente no fluido de corte após 1h da sua utilização na máquina. O

fluido de corte novo adicionado ao sistema se apresentava sem presença de bactérias e fungos.

As quantidades de bactérias e fungos no FCM foram maiores em relação ao FCV. Porém, após o processo de desinfecção com o ozônio a quantidade de fungos do FCM apresentou queda. Já as bactérias do FCM, fungos e bactérias do FCV não apresentaram diminuição da quantidade após o processo de desinfecção com o ozônio, demonstrando que o processo de desinfecção utilizado não foi eficiente para inativar o crescimento destes microrganismos no fluido de corte.



		Antigo	1h	2h	14h	45h	86h	116h	126h	138h	153h	166h
Bactérias FCM	Média	$1,9 \times 10^6$	$8,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$
	Desv. Pad.	$4,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	$8,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
Fungos FCM	Média	$8,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$5,3 \times 10^1$	$2,7 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$4,7 \times 10^1$
	Desv. Pad.	$3,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^1$	$2,1 \times 10^2$	$3,5 \times 10^1$	$5,8 \times 10^0$	$9,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$	$3,2 \times 10^1$
Bactérias FCV	Média	$1,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	$5,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^5$
	Desv. Pad.	$3,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^1$	$8,7 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$5,8 \times 10^0$	$4,2 \times 10^2$	$5,8 \times 10^1$	$3,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^5$
Fungos FCV	Média	$9,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$5,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$3,7 \times 10^1$	$5,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
	Desv. Pad.	$3,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$5,8 \times 10^0$	$2,1 \times 10^1$	$4,2 \times 10^2$	$5,8 \times 10^1$	$5,8 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$

**Figura 8 - Quantidade de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos no FCM e FCV e seus respectivos desvios padrão (Desv. Pad.) ao longo do estudo com o processo normal e com o processo de desinfecção (catalisador eletrofísico).**

Fonte: Autoria própria.

O processo de limpeza realizado na máquina antes da inserção do fluido de corte, não removeu todos os microrganismos, visto que após 1 hora já apresentava crescimento de bactérias e fungos nos fluidos. O fluido de corte antigo, antes de inserir

o FCM tinha concentrações de bactérias e fungos próximas a  $1,9 \times 10^6$  e  $8 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente. Após 1 hora da inserção do FCM na máquina, a quantidade de bactérias e fungos apresentou-se próximo de  $8,3 \times 10^3$  (0,4% de UFC/mL) e  $7 \times 10^1$  (8,8% de UFC/mL do valor antes da limpeza), respectivamente. A mesma situação ocorreu com o FCV, onde o fluido de corte antigo antes do processo de limpeza apresentava concentrações de bactérias e fungos próximas de  $1,2 \times 10^5$  e  $9,6 \times 10^4$  UFC/mL, respectivamente. Após 1 horas a quantidade era de  $4,1 \times 10^2$  (0,3% de UFC/mL) e  $1 \times 10^3$  (1,0% de UFC/mL).

Como todo o fluido de corte antigo foi retirado do sistema, pode-se supor que a persistência dos microrganismos no sistema é pelo fato destes ficarem aderidos à máquina. Os microrganismos têm a capacidade de se fixar em suporte abiótico formando biofilme (XAVIER et al, 2003), podendo este ser a explicação para a rápida recontaminação do fluido novo adicionado.

Segundo Davies (2003), as bactérias que se estruturam em biofilmes possuem alta resistência, tornando as células do biofilme de 10 a 1000 vezes mais tolerantes a agentes antimicrobianos do que a mesma bactéria em vida livre. Trentin et al. (2013) destacam que os fatores que contribuem para a resistência dos biofilmes frente aos antimicrobianos, são: a baixa penetração de agentes químicos no interior do biofilme devido a matriz de polímeros extracelulares presente e reduzida taxa metabólica no interior do biofilme (comumente na base da estrutura). O baixo metabolismo dessas células garante a resistência do biofilme, visto que os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano. Segundo Trafny et al. (2015), os biofilmes formados na máquina ferramenta tendem a se tornar resistentes e os biocidas acabam não sendo eficazes contra eles.

Veillette et al. (2004) verificaram que após a inserção do fluido de corte novo na máquina ferramenta, houve um rápido crescimento de microrganismos, apresentando uma contagem de  $1,6 \times 10^3$  UFC/mL em apenas 12 horas após a inserção do fluido, sendo que o valor do fluido antigo era de  $4,5 \times 10^5$  UFC/mL. Os autores acreditam que a rápida contaminação se dá pelo fato dos biofilmes na máquina que não foram devidamente removidos no processo de limpeza.

Após 126 horas de uso da máquina (antes da aplicação do sistema de desinfecção), a concentração de bactérias e fungos no FCM estava na ordem de  $10^5$  e  $10^2$  UFC/mL, respectivamente, enquanto no FCV ambos se apresentavam na ordem de  $10^2$  UFC/mL. No trabalho de Bakalova et al. (2007) após 3 meses de estudo em

um fluido de corte operado em máquina ferramenta foram contabilizados  $6,5 \times 10^5$  UFC/mL, sendo  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL de bactérias Gram-positivas e  $5,1 \times 10^5$  de Gram-negativas. O crescimento de fungos filamentosos não foi evidenciado no primeiro mês de estudo, porém, no terceiro mês, estes estavam presentes, porém não foram quantificados no estudo em questão.

No estudo de Trafny et al. (2015) as quantidades de bactérias encontradas nas máquinas estudadas, que estavam em uso de 6 a 9 meses, estavam superiores a  $10^6$  UFC/mL. No trabalho de Rabeinstein et al. (2009), as contagens de bactérias alcançaram a ordem de grandeza de  $10^6$  UFC/mL e os fungos  $10^4$  UFC/mL nos fluidos de corte a base de óleo mineral após 24 semanas de análise. As quantidades encontradas nos trabalhos citados, estão acima do presente estudo na coleta de 126 horas, porém, na coleta de 166 horas os valores encontrados, são próximas aos estudos citados.

Após ligado o catalisador eletrofísico no reservatório da máquina, a tendência dos microrganismos estudados foi de aumento, exceto para os fungos do FCM. Este resultado não foi o esperado, pois a função do catalisador seria de matar os microrganismos presente no reservatório. Na coleta de 166 horas a concentração de bactérias no FCM estava na ordem de  $10^6$  UFC/mL. E no FCV, as concentrações de bactérias e fungos apresentaram na ordem de  $10^6$  e  $10^3$  UFC/mL, respectivamente.

Esse aumento no número de UFC dos microrganismos nos fluidos de corte após a aplicação do ozônio, pode ter sido pelo fato do ozônio reagir com outros compostos presentes no fluido, como por exemplo o biocida. Esta interação do ozônio com o biocida pode ser elucidada pelo trabalho de Jagadevan et al. (2013), onde foi aplicado a ozonização em três biocidas comumente encontrados nas formulações de fluido de corte (os biocidas foram dissolvidos em água destilada em concentrações usualmente utilizada em fluido de corte). Os resultados demonstraram que os compostos foram degradados acima de 80%. Estes resultados podem justificar o aumento da quantidade de microrganismos no presente trabalho, pelo fato do processo de ozonização aplicado no fluido de corte ter degradado o biocida do fluido, podendo ter diminuído o fator inibidor do desenvolvimento dos microrganismos.

As altas cargas de contaminação bacteriana ou fúngica são um problema de higiene e representam um risco para a saúde dos trabalhadores (RABEINSTEIN et al. 2009). Além disso, elevado nível de contaminação microbiana é uma das principais causas de deterioração de fluido de corte utilizado em usinagem de metais (TRAFNY

et al., 2015). No trabalho de Van der Gast et al. (2003) foi observado correlação da quantidade de bactérias com a Demanda Química de Oxigênio - DQO (medida indireta de matéria orgânica) do fluido de corte, verificando que a abundância bacteriana exibiu relação inversa linear com a DQO, refletindo a forte influência da alta concentração de microrganismos na diminuição de matéria orgânica presente (por exemplo, o óleo).

O aumento da quantidade de microrganismos no presente estudo acompanhou o aumento de degradação do óleo. Desse modo, os resultados indicaram que os microrganismos podem ter influenciado diretamente na degradação do óleo, ressaltando assim a importância do controle do mesmo para que prolongue a vida útil dos fluidos.

### 3.3.2 Isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos

Foram isolados 65 colônias de bactérias heterotróficas e 73 colônias de fungos filamentosos do FCM e 55 colônias de bactérias e 82 colônias de fungos no FCV. Na Tabela 3 estão detalhadas as quantidades de colônias isoladas com características coloniais diferentes obtidas em cada coleta de amostra.

Observa-se que em ambos os fluidos a quantidade total de fungos isolados foi maior do que a de bactérias. Mesmo após o processo de desinfecção com o ozônio iniciar no sistema.

**Tabela 3 - Quantidade de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos isolados nas coletas de amostra de FCM e FCV.**

	Coleta (horas)	Bactérias Heterotróficas		Fungos Filamentosos	
		FCM	FCV	FCM	FCV
Processo normal	1	8	4	14	10
	2	2	4	5	7
	14	7	5	2	7
	45	10	5	3	8
	86	7	4	4	4
	116	8	7	4	15
	126	4	5	20	6
Processo com catalisador	138	3	6	8	6
	153	9	8	6	4
	166	7	7	7	15
Total		65	55	73	82

Em relação ao isolamento de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos é possível observar que ao longo do estudo a quantidade de colônias isoladas com características diferentes foi variada. No FCM a quantidade de colônias isoladas na 1ª hora de uso da máquina foi de 8 para bactérias e 14 para fungos, sendo que na coleta de 45h foram isoladas 10 colônias de bactérias e na coleta de 126h foram isoladas 20 colônias de fungos. Este aumento de colônias com características coloniais diferentes também foi evidenciado no FCV, onde apresentava 4 colônias de bactérias e 10 colônias de fungos no início do estudo chegando a 8 colônias de bactérias na coleta de 153h e 10 colônias de fungos na coleta de 126h.

A variação da quantidade de isolados diferentes ao longo do estudo pode indicar que estava ocorrendo contaminação externa no fluido de corte, pois se não houvesse a ação externa, a quantidade de isolados seria constante ou teria diminuído ao longo do estudo. Há diversas formas para que ocorra a contaminação microbiana no fluido de corte, entre eles pode se destacar a contaminação pelo próprio trabalhador que manipula as peças e também pelas partículas de poeiras e aerossóis que podem conter microrganismos e contaminar o sistema (SULIMAN et al., 1997; RABEINSTEIN et al. 2009).

Além dos microrganismos degradarem o fluido de corte, estes podem ser agentes patogênicos, representando um risco para a saúde dos trabalhadores, pois podem ser capazes de causar doenças para os funcionários que manipulam as peças usinadas ficando expostos a aerossóis provenientes do processo de usinagem na máquina ferramenta (PASSMAN; ROSSMOORE, 2002, BAKALOVA et al., 2007, RABEINSTEIN et al. 2009).

### **3.3.3 Teste de capacidade de degradação do fluido de corte e dos óleos mineral e vegetal**

Das 50 colônias de bactérias isoladas do FCM selecionadas para o teste de capacidade de degradação do FCM e do óleo mineral, 21 (42%) foram capazes de degradar o óleo mineral. Enquanto das colônias de fungos filamentosos isolados do FCM, 42 (84%) foram capazes de degradar o óleo analisado. Por outro lado, das

colônias de bactérias e fungos isolados do FCV, 27 (54%) e 37 (74%), respectivamente, foram capazes de degradar o óleo vegetal.

Na Figura 4 é possível observar o tempo que o microrganismo analisado necessitou para degradar o fluido de corte, óleo novo e os óleos dos tempos 126h e 166h.

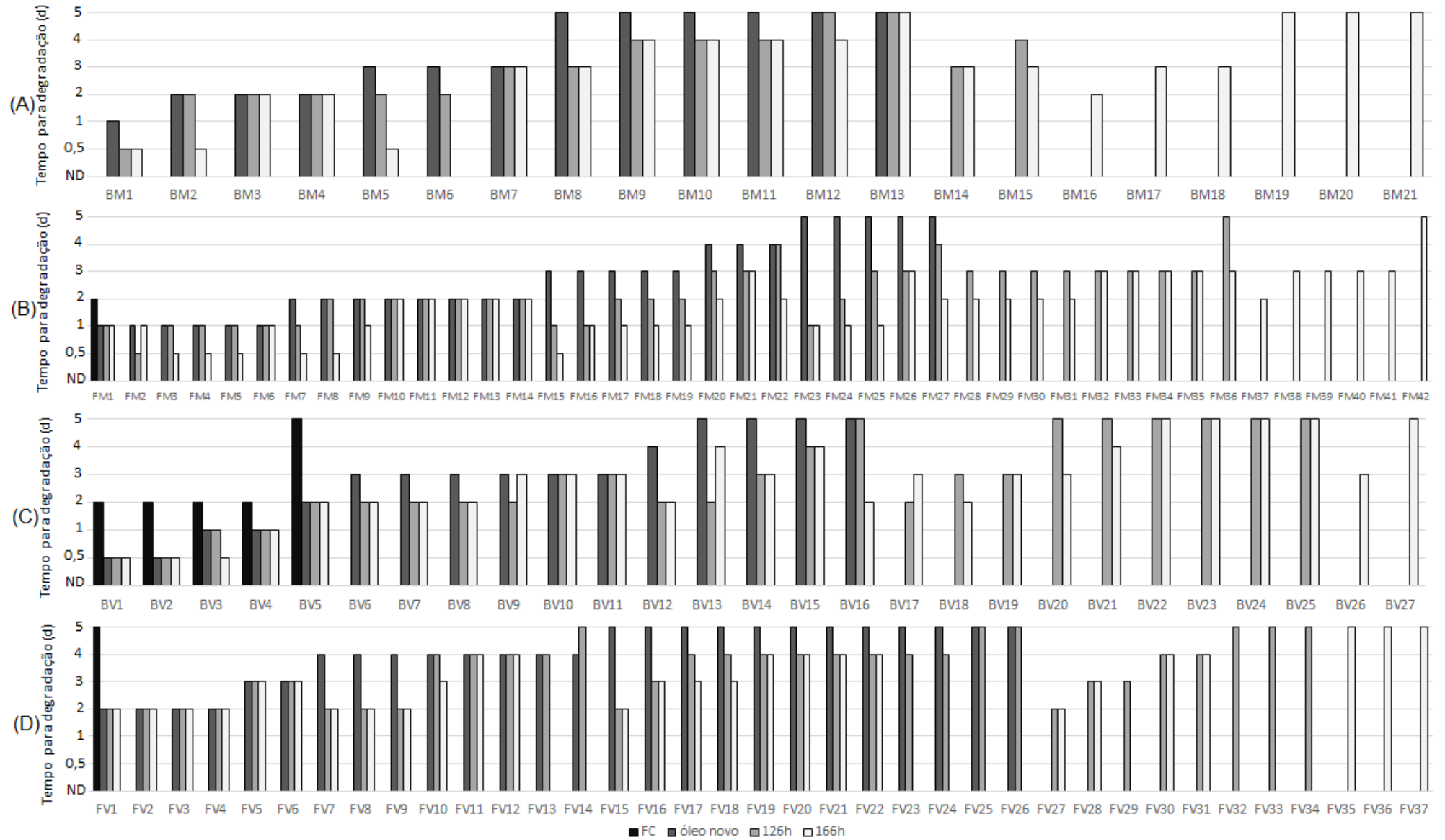
Os isolados de bactérias do FCM não foram capazes de degradar o FCM, já os óleos avaliados foram degradados. O isolado de bactéria BM5 não foi capaz de degradar o fluido de corte após 5d de análise, porém foi capaz de degradar o óleo novo separado do fluido de corte após 3d. O óleo de 126h foi degradado em tempo menor (2d) já o óleo de 166h em 0,5d, demonstrando que o óleo sofreu modificações ao longo do uso do fluido, sendo que ficou mais facilmente biodegradável ao longo do tempo. As demais bactérias do FCM analisadas também apresentaram capacidade de degradar o óleo mais facilmente após 166h de uso. Porém a bactéria BM6 não foi capaz de degradar o óleo de 166h após 5 dias de análise, sendo que o óleo novo e o óleo de 126h foram degradados em 2 e 1 dia, respectivamente. Este resultado pode demonstrar que o microrganismo em questão é capaz de degradar algum composto do óleo novo e do óleo de 126h, porém após a degradação deste composto, este microrganismo não é mais capaz de degradar o óleo.

Verifica-se que a maioria dos microrganismos foram capazes de degradar o óleo constituinte do fluido de corte, porém não foi capaz de degradar o fluido de corte novo, este resultado pode indicar que o biocida que estava incorporado no produto inativou os microrganismos analisados.

Os fungos filamentosos do FCM FM7, FM15, FM17, FM18, FM19, FM20, FM21, FM24, FM25 FM27, FM28, FM29, FM31 e FM36 foram capazes de degradar o óleo e apresentaram a tendência de queda do tempo de degradação com o aumento da utilização do óleo. O fungo FM1 foi capaz de degradar o FCM, sendo possível avaliar que, possivelmente, este microrganismo seja resistente ao biocida utilizado no fluido de corte.

Em relação as bactérias do FCV, observa-se que as bactérias BV1, BV2, BV3 e BV4 foram capazes de degradar o FCV em 2 dias de análise e a bactéria BV5 em 5 dias de análise, os demais foram capazes de degradar somente o óleo. Já os fungos filamentosos, apenas o FV1 capaz de degradar o FCV. Verificou-se também que 9 fungos (FV14, FV23, FV24, FV25, FV26, FV29, FV32, FV33 e FV34) apresentaram comportamento de aumento de tempo de degradação com o envelhecimento do óleo,





**Figura 9 - Capacidade de degradação das fontes de carbono analisadas em 0,5; 1; 2; 3 e 5d e quando não apresentou degradação foi representado como ND. (A) Isolados de bactérias do FCM; (B) Isolados de fungos do FCM; (C) Isolados de bactérias do FCV; (D) Isolados de fungos do FCV.**

demonstrando que estes microrganismos participam na biodegradação parcial do óleo.

Segundo Van der Gast et al. (2001), o fluido de corte se torna vulnerável à contaminação microbiana, pois o óleo acaba sendo utilizado como substrato pelos microrganismos. Este fato pode ser notado nos resultados deste presente trabalho (Figura 4), onde 42% dos isolados de bactérias e 84% dos fungos filamentosos foram capazes de degradar o óleo mineral. Enquanto 54% dos isolados de bactérias e 74% dos fungos filamentosos foram capazes de degradar o óleo vegetal.

Em relação as bactérias, verificou-se que o óleo vegetal foi mais susceptível a degradação microbiana, sendo estas uma das desvantagens da utilização desse óleo. Smith (2008) ressalta que o óleo vegetal pode ser mais susceptível ao crescimento microbiano, fazendo com que o fluido contaminado no reservatório de uma máquina, tenha seu tempo de vida útil diminuído.

Em ambos os fluidos analisados verificou-se que houve maior quantidade de fungos capazes de degradar o óleo do que bactérias, podendo ser este um dos fatos que levaram ao maior número de isolados de fungos filamentosos do que bactérias heterotróficas.

Outros trabalhos também avaliaram a potencialidade dos microrganismos de degradarem o fluido de corte. Bakalova et al. (2007) avaliou 15 isolados de fluido de corte quanto a capacidade de degradar hidrocarbonetos, sendo que 10 foram capazes de degradar o composto em questão. Enquanto Rabeinstein et al. (2009), verificou que os microrganismos isolados do fluido de corte a base de óleo mineral não foram capazes de utilizar o óleo mineral como uma única fonte de carbono.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os resultados demonstraram que em ambos os fluidos foi evidenciado o crescimento de microrganismos. Ao longo do estudo foi verificada a degradação do fluido de corte por meio de alterações químicas do óleo mineral e vegetal. As bactérias heterotróficas e fungos filamentosos isolados dos fluidos analisados foram capazes de utilizar o óleo como fonte de carbono, verificando que estes participam diretamente na degradação do fluido de corte. O catalisador eletrofísico com fluxo de ozônio não foi eficiente para a desinfecção de fluidos de corte, pois estes não diminuíram a quantidade de microrganismos no fluido de corte.

## REFERÊNCIAS

BAKALOVA, S., DOYCHEVA, A., IVANOVA, I., GROUDEVA, V., DIMKOV, R., 2007. Bacterial microflora of contaminated metalworking fluids. **Biotechnol. Biotechnol.** Eq. 21, 437 e 441. DOI: 10.1080/13102818.2007.10817490

BIDOIA, E.D., MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M. 2010 Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 2, A. Méndez-Vilas, 1277-1288.

CELLA R.C.F., REGITANO-D'ARCE M.A.B., SPOTO M.H.F. 2002. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimento de origem vegetal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 22, 2, 111-116. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612002000200002>

DAVIES, D.G., 2003, "Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents", **Nature Reviews Drug Discovery**, Vol. 2, No. 2, pp. 114-122. doi:10.1038/nrd1008

DILGER, S., FLURI, AL., SONNTAG, H.G., 2005, Bacterial contamination of preserved and non preserved metal working fluids, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 208, 6, 467-476. doi:10.1016/j.ijheh.2005.09.001

DINIZ, A.E., Marcondes, F. C., Coppini, N. L. **Tecnologia da usinagem dos materiais**. São Paulo: MM Editora, 1999.

ERNST, H., 1951. Fundamental aspects of metal cutting and cutting fluid action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 53, 936-961. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1951.tb54246.x

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol. Tech.**, 7, 745-748. doi: 10.1007/BF00152624

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 2008. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAGADEVAN, S., GRAHAMB, N.J., Thompson, I.P. 2013. Treatment of waste metalworking fluid by a hybrid ozone-biological process. **J. Hazard. Mater.**, 244-245, 394-402. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.10.071

KOCH, T., PASSMAN, F., RABENSTEIN, A., 2015. Comparative study of microbiological monitoring of water-miscible metalworking fluids. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 98, 19-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.015>

LIMA J.R., GONÇALVES L.A.G. 1994. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. **Química Nova**, 17, 5, 392-396.

LODDERS, N., KÄMPFER, P. 2012. A combined cultivation and cultivation-independent approach shows high bacterial diversity in water-miscible metalworking fluids. **Systematic and Applied Microbiology**. 35, 4, 246-252. doi: 10.1016/j.syapm.2012.03.006

MIRANDA, R.C., SOUZA, C.S.S., GOMES, E.B., LOVAGLIO, R.B., LOPES, C.E.L., SOUZA, M.F.V.Q. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of suape port in the state of Pernambuco - **Brazil. Braz. arch. biol. technol.** 50, 1, 147-152. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000100018>

OLIVEIRA J.P., ANTUNES P.W.P., PINOTTI L. M., CASSINI S.T.A. 2014. Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. **Quim. Nova**, 37, 4, 597-602. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140094>

PASSMAN, F.J., ROSSMOORE, H.W. 2002. Reassessing The Health Risks Associated With Employee Exposure To Metalworking Fluid Microbes©, **Journal of the Society of Tribologists and Lubrication Engineers**, 58, 30-38.

PIUBELI F.A., GOMES R., ARRUDA O.S., ARRUDA M.S.P., BIANCHI E.C., SILVA JUNIOR C.E., AGUIAR P.R., CATAI R.E. 2008. Caracterização Microbiológica de uma emulsão mineral utilizada como fluido de corte no processo de usinagem. **Revista Iberoamericana de Ingeniería Mecánica**. 12, 1, 35-41.

RABENSTEIN, A., KOCH, T., REMESCH, M., BRINKSMEIER, E., KUEVER, J., 2009. Microbial degradation of water miscible metal working fluids. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 63, 1023-1029 doi: 10.1016 / j.ibiod.2009.07.005

RAO, D.N., SRIKANT, R.R., RAO, C.S. 2007. Influence of Emulsifier Content on Properties and Durability of Cutting Fluids. **J. of the Braz. Soc. of Mech. Sci. & Eng.** XXIX, 4, 396-400. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-58782007000400008>

RODINA, A.G. Methods in aquatic microbiology. **Baltimore. University Park Press.** 1972. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.19730130834/abstract>

SAHA, R., DONOFRIO, R.S. 2012. The microbiology of metalworking fluids. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 94, 5, 1119-1130. doi: 10.1007/s00253-012-4055-7

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S. Gomes, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise microbiológica de Alimentos e água.** 4ª ed., São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

SMITH, G. T. **Cutting Tool Technology:** Industrial Handbook. Springer: 2008.

SULIMAN, S.M.A.; ABUBARK, M. I.; MIRGHANI, E. F. Microbial contamination of cutting fluids and associated hazards. **Tribology International.** Vol. 30. N. 10. p. 753-757. 1997. doi:10.1016/S0301-679X(97)00058-3

TRAFNY, E.A., LEWANDOWSKI, R., KOZLOWSKA, K., ZAWISTOWSKA-MARCINIAK, I., STEPINSKA, M., 2015. Microbial contamination and biofilms on machines of metal industry using metalworking fluids with or without biocides. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 99, 31-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.015>

TRENTIN, D.S., GIODANI, R.B., Macedo, A.J, 2013, Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, 14, 22, 113-238.

VAN DER GAST, C.J.; KNOWLES, C.J.; WRIGHT, M.A.; THOMPSON, I P. 2001 Identification and characterization of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology. **International Biodeterioration & Biodegradation.** 47, 113-123. doi:10.1016/S0964-8305(01)00036-1

VAN DER GAST, C.J., WHITELEY, A.S., LILLEY, A.K., KNOWLES, C.J., THOMPSON, I.P. 2003. Bacterial community structure and function in a metal-working fluid. **Environmental Microbiology.** 5, 453-461.

VEILETTE, M., THORNE, P.S., GORDON, T., DUCHAINE, C. 2004. Six Month Tracking of Microbial Growth in Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging. **Ann. occup. Hyg.**, 48, 6, 541-546.

XAVIER, J.B., PICIOREANU, C., ALMEIDA, J.S., VAN LOOSDRECHT, M.C M.. 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 76, 1, 2-13.

ZIRBES R., ROLIM J.G., ZURN H.H. 2005. Metodologias para avaliação e diagnóstico do estado de isolamento de papel impregnado com óleo mineral. **Revista Controle & Automação**. 16, 3, 318-331. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-17592005000300005>