

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
CÂMPUS APUCÁRANA E LONDRINA**

**PÂMELA NUNES SÁ**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM FLUIDO DE CORTE UTILIZANDO  
BIOCIDAS NATURAIS**

**LONDRINA  
2017**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
CÂMPUS APUCARANA E LONDRINA**

**PÂMELA NUNES SÁ**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM FLUIDO DE CORTE UTILIZANDO  
BIOCIDAS NATURAIS**

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

Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kátia Valeria Marques Cardoso Prates.

Coorientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Craveiro Moreira Andrei.

**LONDRINA  
2017**

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

S111c Sá, Pâmela Nunes

Controle de bactérias presentes em fluido de corte utilizando biocidas naturais / Pâmela Nunes Sá - Londrina: [s.n.], 2017.  
84 f. ; il. ; 30 cm

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia Valeria Marques Cardoso Prates  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Craveiro Moreira Andrei  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2017.  
Bibliografia: f. 78-84

1. Usinagem. 2. Contaminação Microbiana. 3. Fluidos de Corte.  
I. Prates, Kátia Valeria Marques Cardoso, orient. II. Andrei, Isabel Craveiro Moreira, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



**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**

### **CONTROLE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM FLUIDO DE CORTE UTILIZANDO BIOCIDAS NATURAIS**

por

**Pâmela Nunes Sá**

Dissertação de mestrado apresentada no dia três de maio de 2017 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. Dr (ª)- Kátia Valeria Marques Cardoso Prates - Orientadora  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr(ª)- Carlos Elias da Silva Junior - Membro Titular  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr(ª)- Claudio Takeo Ueno - Membro Titular  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr(ª)- Janaína Fracaro de Souza Gonçalves - Membro Titular  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr(ª)- Alessandra Furtado da Silva  
Coordenadora 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

Dedico esse trabalho ao meus pais, Henrique Carlos Moreira Sá e Maria Nita Nunes Sá, e à minha irmã, Heleny Nunes Sá, que nunca mediram esforços para que os meus sonhos fossem realizados e por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava, por serem minha base, meu mundo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me permitir sonhar e conquistar meus sonhos; por nunca me abandonar; por me guiar nos momentos de fraqueza, e por me dar saúde para chegar até aqui.

Agradeço a Nossa Senhora por me cobrir com seu manto de amor e por me amparar e por ser minha mãe nos momentos em que me senti sozinha.

Aos meus pais e irmã, por sonharem comigo, por me apoiarem, por terem sempre um gesto de carinho, por serem minha principal fonte de inspiração, força e determinação e por me amarem sempre.

À Maria Helena por ser a dona do sorriso que alegrava meus dias tristes, por ser fonte de inspiração e motivação na reta final do meu mestrado.

Ao meu namorado, Marco André da Silva Lima, por todo apoio, compreensão, ajuda, incentivo, paciência e carinho.

Ao meu cunhado, Thiago Chaves, por toda ajuda e incentivo nos momentos de dificuldades.

À irmã que o mestrado e a vida me deram, Camila Zoe. Não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos, conversas, amizade, carinho, não sei o que faria sem você em certos momentos. Te amo.

A irmã loira que eu nunca tive, Jaqueline Bonilha, e toda sua família, por terem sido os primeiros a me acolherem e cuidarem de mim em Londrina. Jamais esquecerei do carinho, amor e atenção.

Aos amigos e colegas de laboratório, Laura Lahr, Eduardo Rodrigues, Edgar Alibert, Vitoria Marcieirinha, Matheus Lee, Joyce Pifano, Rafael Rossi, Daniel Dantas, pelas risadas, pelos bons e maus momentos, pela parceria dentro e fora do laboratório.

Às amigas Caroline Ponce, Mônica Belfort, Fernanda Belfort, Caroline Shingu, Patrícia Godoi, Patrícia Francisquini, Amanda Carvalho, Fernanda Freitas, Mariane Trannin, Leticia Javara, Ludmila Takagaki e ao grupo de oração Vida e Paz por ser minha família em Londrina.

Às amigas Amanda Carvalho e Fernanda Freitas por tudo que vivemos, aprendemos, conversamos e por tudo que ainda está por vir.

Aos professores Carlos Raimundo Ferreira Grosso e Lyssa Setsuko Sakanaka por toda colaboração durante a execução do trabalho.

À professora Ana Cláudia Lira Guedes, representante da Embrapa Amapá, pelo auxílio e doação de material para elaboração do trabalho.

À minha orientadora, Kátia Valéria Cardoso Marques Prates, por todo o conhecimento repassado, paciência, ensinamentos, por aparecer no momento mais importante do meu mestrado, por incentivar novas conquistas, por abrir um novo caminho de possibilidades e por ser a “mãe” nos momentos que precisei.

À minha coorientadora, Isabel Craveiro Moreira Andrei, por todo carinho, dedicação, paciência, ensinamentos e brincadeiras ao longo deste trabalho.

À professora Janaina Fracaro de Souza Gonçalves, por todos os ensinamentos, paciência e orientação.

Serei eternamente grata a Deus por todas as oportunidades e desafios que ele me proporcionou, mas, principalmente, serei grata pelas pessoas que ele pôs em meu caminho, porque eu não teria a capacidade de escolher todos esses amigos ao meu redor e hoje tenho a grata felicidade de chamá-los de família.

A Deus toda honra, glória e poder.

*"Nada é tão nosso como os  
nossos sonhos".*  
(Autor: Friedrich Nietzsche)



## RESUMO

SÁ, P. N. **Controle de bactérias presentes em fluido de corte utilizando biocidas naturais**. 2017. 83 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA), Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

Fluidos de corte são utilizados para auxiliar no processo de usinagem, tendo por finalidade a refrigeração. Além disso, promove a lubrificação, a diminuição do atrito em relação à peça usinada e a ferramenta de corte, aumentando assim a eficiência do trabalho das fábricas. No sistema de usinagem, pode ocorrer o crescimento de microrganismos, uma vez que estes utilizam o fluido de corte como fonte de alimento, reduzindo assim a vida útil dos fluidos, proporcionando perdas econômicas e causando danos à saúde do operador da máquina. Para minimizar a presença de microrganismos, são utilizados produtos químicos denominados biocidas, que em altas concentrações pode causar danos à saúde. Dentro desse panorama, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon winterianus* (citronela) *Syzygium aromaticum* (cravo) e *Carapa guianensis* (andiroba) como agentes de controle do crescimento de bactérias em substituição ao biocida no sistema de usinagem. Inicialmente, foram realizadas coletas de fluido de corte em uma indústria automobilística para quantificar, isolar e caracterizar as bactérias (heterotróficas e potencialmente patogênicas) presentes no fluido de corte. Na sequência, as bactérias isoladas foram testadas quanto a susceptibilidade às diferentes concentrações dos óleos essenciais. O estudo procurou definir a concentração mínima inibitória (CMI) e antibiograma para avaliar a resistência a antibióticos das bactérias isoladas. Realizou-se, então, o teste de tempo de contato dos óleos essenciais e de encapsulamento do óleo essencial de citronela por meio da técnica de gelificação iônica, que consistiu em simular a situação do reservatório (i) com óleo encapsulado, (ii) com óleo misturado diretamente ao fluido de corte (iii) com fluido de corte contaminado, com o objetivo de avaliar a melhor forma de aplicação dos óleos no sistema de usinagem. Dentre os resultados, obteve-se  $1,63 \times 10^7$  e  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL de bactérias heterotróficas e  $3,5 \times 10^5$  e  $2 \times 10^6$  UFC/mL de bactérias potencialmente patogênicas, na primeira e segunda coleta de fluidos, respectivamente. Foram isolados seis grupos de bactérias correspondentes às seguintes espécies: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter spp*. A bactéria que apresentou maior resistência aos antibióticos testados foi a *Acinetobacter spp*. As que apresentaram maior sensibilidade foram a *Enterobacter cloacae* (A2), *Escherichia coli* (A3) e *Proteus mirabilis* (A6). O óleo de *Syzygium aromaticum* teve o maior halo formado na menor concentração testada (0,25%) - 11,07 mm, seguido por *Ocimum gratissimum*, com halo de 11,0 mm, e *Cymbopogon winterianus*, 10,7 mm. No teste de tempo de contato, o menor tempo de redução de crescimento ocorreu em 1 minuto para *Ocimum gratissimum*; 5 minutos para *Syzygium aromaticum* e 10 minutos para *Cymbopogon nardus*. O teste de encapsulamento foi realizado com o óleo de *Cymbopogon nardus*, obtendo-se redução significativa nas duas formas de aplicação do óleo essencial.

**Palavras-chave:** encapsulamento, óleos essenciais, contaminação microbiológica, usinagem.

## ABSTRACT

SÁ, P. N. **Control of bacteria present in cutting fluid using natural biocides.** 2017. 83 p. Dissertation (Master's degree). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA), Câmpus Apucarana/Londrina, Federal Technological University of Paraná, Londrina, Brazil, 2017.

Cutting fluids are used to aid in the machining process, with the purpose of cooling, besides promoting lubrication, reducing friction in relation to the machined part and the cutting tool, thus increasing the efficiency of the work of the factories. In the machining system, the growth of microorganisms can occur, since they use the cutting fluid as food source, thus reducing the useful life of the fluids and providing economic losses and causing damages to the health of the worker. To minimize the presence of microorganisms is used a chemical called biocide, which in high concentrations can cause health damage. The objective of this research was to evaluate the efficiency of the essential oils of *Ocimum gratissimum* (Alfavaca), *Cymbopogon nardus* (Citronella) *Syzygium aromaticum* (Clove) and *Carapa guianensis* (andiroba) as a control agent for the growth of bacteria in replacement of the biocide in the machining system. Initially, cutting fluid samples were collected in an automobile industry to quantify, isolate and characterize the bacteria (heterotrophic and potentially pathogenic) present in the cutting fluid. Following the isolated bacteria were tested for susceptibility to the different concentrations of the oils to define the minimum inhibitory concentration (MIC) and antibiogram to evaluate the resistance of the bacteria isolated to antibiotics. The contact time test of the essential oils and encapsulation of the essential oil of Citronella was carried out by means of the ionic gelation technique, which consisted of the simulation of reservoirs containing cut fluid contaminated with encapsulated oil, with oil mixed directly with the oil. Cutting fluid and reservoir containing only contaminated cutting fluid, in order to evaluate the best way of applying the oils in the machining system. Among the results obtained were  $1.63 \times 10^7$  and  $2.2 \times 10^7$  CFU / mL heterotrophic bacteria and  $3.5 \times 10^5$  and  $2 \times 10^6$  CFU / mL of potentially pathogenic bacteria in the first and second fluids collection, respectively. Six groups of bacteria were isolated, corresponding to the following species: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter* spp. The bacterium that presented the highest resistance to the antibiotics tested was *Acinetobacter* spp and the ones with the highest sensitivity were *Enterobacter cloacae* (A2), *Escherichia coli* (A3) and *Proteus mirabilis* (A6). The oil of *Syzygium aromaticum* had the largest halo formed by the lowest concentration tested (0.25%) -11.07 mm, followed by *Ocimum gratissimum* with halo of 11 mm and *Cymbopogon nardus* 10.7 mm. In the test of contact time the shortest time reduction occurred in 1 minute for *Ocimum gratissimum*, 5 minutes for *Syzygium aromaticum* and 10 minutes *Cymbopogon nardus* for 4 of 6 bacterial isolates. The encapsulation test was performed with the *Cymbopogon nardus* oil, obtaining a significant reduction in the two forms of essential oil application.

Keywords: Encapsulation, essential oils, microbiological contamination, machining.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	26
<b>Figura 2</b> – Sementes de Carapa guianeses .....	27
<b>Figura 3</b> – Folhas de <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	28
<b>Figura 4</b> - Botões de flores secas e flores de <i>Syzygium aromaticum</i> .....	29
<b>Figura 5</b> -Fluxograma contendo as atividades executadas nas diferentes etapas da pesquisa.....	33
<b>Figura 6</b> - Aparato para extração de óleo essencial .....	34
<b>Figura 7</b> - Máquina utilizada para coleta de fluido de corte, centro de usinagem HELLER MCI25.....	36
<b>Figura 8</b> - Locais de coleta do fluido de corte .....	37
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática da metodologia para contagem de colônias de bactérias.....	38
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática do isolamento de bactérias e caracterização morfológica .....	40
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática da preparação do estoque das culturas bacterianas.....	41
<b>Figura 12</b> - Comparação da turbidez da suspensão bacteriana preparada com o padrão de turbidez de 0,5 da Escala McFarland.....	42
<b>Figura 13</b> - Diagrama do teste de sensibilidade a antibiótico (antibiograma) e medida em milímetros do halo de inibição ao redor dos discos contendo antibiótico. ....	44
<b>Figura 14</b> - Representação esquemática do teste de tempo de contato das bactérias com os óleos essenciais. ....	46
<b>Figura 15</b> - Demonstração da preparação do encapsulamento do óleo essencial. ...	48
<b>Figura 16</b> - Representação esquemática do teste de eficiência de aplicação do óleo essencial .....	49
<b>Figura 17</b> - Resultado do isolamento das bactérias potencialmente patogênicas utilizando o meio de cultura seletivo CHROMagar Orientation.....	52
<b>Figura 18</b> - Resultado da microscopia óptica após aplicação da técnica de coloração de Gram para cada grupo de bactérias potencialmente patogênicas isoladas (aumento de 1.000 vezes).....	53
<b>Figura 19</b> - Exemplo de placa de Petri apresentando os halos formados nos testes de antibiograma realizados com <i>Proteus mirabilis</i> (A6). ....	56
<b>Figura 20</b> - Demonstração de halo formado no teste de disco-difusão utilizando o óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela) com a bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> - A5.....	57
<b>Figura 21</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavacão).....	58
<b>Figura 22</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavacão) descontando o efeito do solvente etanol. ....	59
<b>Figura 23</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela). ....	60
<b>Figura 24</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela) descontando o efeito do solvente etanol. ....	61
<b>Figura 25</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo). ....	62
<b>Figura 26</b> – Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo), descontando o efeito do solvente etanol.....	63

<b>Figura 27-</b> Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de Carapa guianeses (Andiroba).....	64
<b>Figura 28</b> - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de Carapa guianeses (Andiroba), descontando o efeito do solvente etanol. ....	64
<b>Figura 29</b> - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de Ocimum gratissimum (alfavacão) na concentração de 0,25%.....	67
<b>Figura 30</b> - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de Cymbopogon winterianus (citronela) na concentração de 0,25%.....	69
<b>Figura 31</b> - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de Syzygium aromaticum (cravo) na concentração de 0,25%.....	70
<b>Figura 32</b> - Sistema de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte .....	71
<b>Figura 33</b> - Resultado do crescimento de bactérias em placas de Petri nos sistemas de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte. ....	74
Continuação <b>Figura 33</b> - Resultado do crescimento de bactérias em placa de Petri nos sistemas de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte. ....	75

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Localização de infecções por Enterobactérias mais comuns, enumeradas por ordem de prevalência.	22
<b>Quadro 2</b> – Classificação e características das colônias bacterianas que crescem em meio BD CHROMagar <i>Orientation Medium</i> .....	40
<b>Quadro 3</b> – Características de coloração no CHROMagar e morfotintorial das bactérias presentes no fluido de corte.....	54
<b>Quadro 4</b> – Grau de sensibilidade das bactérias em relação aos antibióticos.....	55
<b>Quadro 5</b> –Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (alfavacão) .....	67
<b>Quadro 6</b> – Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela) .....	68
<b>Quadro 7</b> – Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo) .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - American Type Culture Collection
- BHI - Brain heart infusion
- CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*
- CMI- Concentração mínima inibitória
- mL – Mililitro
- MWF – Fluido de corte miscível em água
- NCTC - National Collection of Type Cultures
- PIB – Produto interno bruto
- Rpm – Rotações por minuto
- SGM – Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral
- UFC - Unidades Formadoras de Colônia
- µl - Microlitro
- UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
3.1 Usinagem .....	18
3.2 Fluidos de corte .....	19
3.3 Bactérias presentes em fluidos de corte .....	20
3.4 Biocidas .....	24
3.5 Óleos essenciais .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 Extração de óleo essencial por arraste a vapor .....	33
4.2 Soluções estoque de óleos essenciais .....	35
4.3 Coleta de amostras de fluido de corte .....	35
4.4 Análise microbiológica .....	37
4.4.1 Quantificação de bactérias .....	37
4.4.2 Isolamento e caracterização morfológica .....	39
4.4.3 Preparação de estoque de cultura bacteriana .....	41
4.4.4 Escala <i>Mcfarland</i> .....	42
4.4.5 Antibiograma .....	43
4.5 Teste disco-difusão .....	44
4.6 Teste de tempo de contato das bactérias sensíveis aos óleos essenciais .....	45
4.7 Preparação do fluido de corte para teste de encapsulamento de óleo essencial por gelificação iônica .....	46
4.8 Teste de encapsulamento de óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> por gelificação iônica .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
5.1 Quantificação, Isolamento e caracterização morfológica das colônias bacterianas .....	50
5.2 Antibiograma .....	55
5.3 Teste de disco-difusão .....	57
5.4 Teste de tempo de contato das bactérias sensíveis aos óleos essenciais .....	66
5.5 Teste de encapsulamento de óleo essenciais <i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela) por gelificação iônica .....	71
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

Os fluidos de corte são utilizados em processos de usinagem de metais, sendo empregados com o intuito de minimizar a geração de calor e promover a lubrificação e remoção de cavacos, aumentando conseqüentemente a eficiência do sistema produtivo e a vida útil da ferramenta (GONÇALVES, 2013)

De modo geral, os fluidos de corte possuem, em sua composição, substâncias químicas utilizadas com o objetivo de otimizar o produto e auxiliar no processo de usinagem, tais como os surfactantes, biocidas e antiespumantes (BURTON et al., 2014). O uso de biocidas como aditivo, no fluido de corte, tem por finalidade reduzir e/ou inibir o crescimento bacteriano.

Durante o processo operacional, faz-se a reposição do volume de fluido de corte, quando se nota que está baixo nas máquinas-ferramentas. Quando se faz o reabastecimento, não existe a preocupação em corrigir a concentração de biocida no sistema de usinagem, ocorrendo que, muitas vezes, a concentração fica acima do recomendado. Isso pode ocasionar problemas dermatológicos nos operadores de máquinas. Além disso, as bactérias presentes no sistema desenvolvem resistência e aumentam a sua concentração, diminuindo a eficiência do produto, o que pode levar a problemas de saúde relacionados à contaminação microbiana.

Os problemas de saúde relacionados ao fluido de corte podem ser causados, principalmente, por bactérias potencialmente patogênicas, tais como espécies do gênero *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Desulfovibrio spp.* (PASSMAN, 2004).

O uso de produtos naturais, como os óleos essenciais, no controle de microrganismos presentes em fluidos de corte pode ser uma alternativa ao uso de biocidas.

Segundo Shokoohi et al. (2015), os estudos sobre a eficácia de óleos essenciais que possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas estão sendo realizados. Os óleos essenciais não apresentam risco à saúde do trabalhador e o seu impacto no meio ambiente é menor em relação aos produtos químicos já utilizados, fazendo com que o tratamento para descarte do fluido de corte possa ser mais simplificado.



Considerando os problemas relacionados ao meio ambiente e à saúde do homem com o crescimento de microrganismos e o uso de biocidas em fluidos de corte, esta pesquisa toma por objetivo avaliar a eficiência dos óleos essencial e vegetal em substituição aos produtos químicos (biocidas) utilizados para a desinfecção do fluido de corte no processo de usinagem. Justifica-se pela importância dos estudos relacionados ao uso de produtos naturais que não causem prejuízo a saúde dos operadores e pela vantagem que esses produtos podem proporcionar para as indústrias de usinagem, pois há redução de custos, melhoramento na qualidade do fluido e não agressão ao meio ambiente, por ser um produto natural.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon winterianus* e do óleo vegetal de *Carapa guianensis* em substituição ao biocida para o controle de bactérias possivelmente patogênicas em fluido de corte no sistema de usinagem.

### 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar bactérias heterotróficas e potencialmente patogênicas presentes em fluido de corte de uma máquina-ferramenta.
- Isolar e caracterizar morfológicamente bactérias potencialmente patogênicas presentes em fluido de corte utilizado em uma máquina-ferramenta.
- Avaliar a menor concentração e o menor tempo de inibição das bactérias isoladas aos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon winterianus* e ao óleo vegetal de *Carapa guianensis*.
- Avaliar a eficiência de inibição das bactérias provenientes do fluido de corte em relação ao encapsulamento do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* quando adicionado no fluido de corte.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção, serão apresentados os conceitos relacionados à usinagem e ao fluido de corte; as bactérias presentes em fluidos de corte e as formas de controlar o crescimento microbiano.

#### 3.1 Usinagem

Segundo o levantamento realizado pela Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral, no ano de 2014, o setor metalúrgico apresentou um PIB (Produto Interno Bruto) de US\$ 34,3 bilhões, o que representou cerca de 1,5% do PIB brasileiro e 5,6% do PIB da indústria. Esse setor tem grande importância para a economia nacional, pois tem relação direta com a metalurgia, usinagem e produção de manufaturados metálicos, como indústrias automobilísticas, construção civil e bens de capital (SGM, 2014).

Segundo Machado et al. (2015), a usinagem pode ser definida como “operação que, ao conferir à peça a forma, dimensões e acabamento, produz cavaco”, por sua vez o cavaco pode ser definido como “porção de material da peça retirada pela ferramenta e caracterizada por apresentar forma geométrica irregular”.

Para Sharman et al. (2016), a usinagem consiste no processo de retirada do excesso de material, o que dá forma e acabamento às peças fabricadas. A remoção desse material ocorre do trabalho mecânico exercido pela máquina-ferramenta sobre a peça a ser moldada. Essa ação acaba por gerar atrito, calor, entre o material a ser fabricado e o equipamento que fabrica a peça devido à sua alta velocidade. Para fazer com que a máquina-ferramenta e a peça a ser usinada não sofram um maior desgaste, fluidos de corte são utilizados, auxiliando ainda na melhoria do corte das máquinas.

A usinagem é constituída por processos convencionais e não convencionais. Como exemplos dos convencionais, pode-se falar de: torneamento, fresamento, furação, aplainamento, mandrilamento, serramento, brochamento, roscamento,

retificação; como exemplo de não convencionais: o jato d'água, jato abrasivo, fluxo abrasivo, ultrassom, eletroquímica, eletroerosão, feixe de elétrons, laser, plasma, química e fotoquímica. Em todos esses processos, independente de serem convencionais ou não, ocorre o processo de remoção de cavacos (MACHADO et al., 2015).

### 3.2 Fluidos de corte.

De acordo com Liu et al. (2012), fluidos de corte são óleos puros ou emulsionáveis utilizados sobre metais com o objetivo de auxiliar no processo de usinagem, reduzindo, dentre outros fatores, o processo de corrosão das máquinas-ferramentas.

Taylor, em 1890, foi um dos precursores da utilização de fluidos de corte no processo de usinagem (TESSARO, 2008). Ele utilizou a água para auxiliar no processo de arrefecimento entre a máquina-ferramenta e a peça a ser usinada. A velocidade de corte foi aumentada entre 30% e 40% por meio da aplicação de uma grande quantidade de água na usinagem de aço com ferramenta de alta velocidade. A água, apesar da alta capacidade de resfriamento, não tem uma boa capacidade de lubrificação, o que leva a problemas de corrosão na máquina-ferramenta e peças de trabalho (TESSARO, 2008; DEBNATH et al., 2014).

Posteriormente, outros produtos foram inseridos no processo de usinagem para que fosse diminuído o processo oxidativo das peças e ferramentas utilizadas, a mistura de água e soda ou água e sabão foram utilizados com esse intuito (TESSARO, 2008).

Os fluidos de corte eram simples, inicialmente, servindo apenas para lubrificar e/ou refrigerar. Entretanto, conforme as operações de corte foram se tornando mais precisas, houve a necessidade de formulações de fluido de corte que atendessem melhor aos requerimentos de cada procedimento (DEBNATH et al., 2014).

Para Vijay et al. (2007), os fluidos de corte podem ser classificados como (i) integrais, óleos solúveis que são emulsionáveis; (ii) fluidos sintéticos e (iii) semissintéticos que podem ter em sua composição aditivos, como biocidas e lubrificantes.

Comercialmente, o fluido de corte é vendido na forma de (i) óleos integrais e de (ii) emulsões aquosas, a base mineral e vegetal, (iii) fluidos sintéticos e (iv) semissintéticos (GONÇALVES, 2013). Podem ser misturados a uma variedade de aditivos, como emulsionantes, aditivos de pressão, agentes de antiespuma, inibidores de corrosão e passivadores metálicos lubrificantes. Além desses aditivos, os fluidos de corte podem conter ainda biocidas, que servem para promover a inibição do crescimento microbiano (LODDERS, N. KÄMPFER, 2012).

Por existirem diferentes compostos químicos na formulação dos fluidos de corte, eles podem causar problemas à saúde dos trabalhadores, que estão em contato constante com os produtos. Um desses compostos é o biocida, que pode causar doenças, como dermatites de contato. Outros componentes presentes no fluido de corte podem facilitar a absorção de biocida pelo trabalhador através da derme (VIJAY et al., 2007).

Aproximadamente 16% do custo com o processo de usinagem está relacionado à compra, preparação e manutenção do fluido de corte. O custo do descarte desse material pode ser de duas a quatro vezes superior ao da sua aquisição. Isso ocorre devido a não biodegradabilidade dos fluidos de corte, necessitando de tratamento antes do seu descarte (DEBNATH et al., 2014). De acordo com Winter et al. (2012), no ano de 2010, cerca de 5,3% do consumo mundial de lubrificantes foi usado para formular MWFs (fluidos de corte miscíveis em água), o que corresponde a cerca de 197 milhões de toneladas.

### 3.3 Bactérias presentes em fluidos de corte

Os fluidos de corte formulados utilizando óleos solúveis, sintéticos e semissintéticos precisam ser diluídos em água para serem usados nas indústrias. Um dos problemas associados ao uso de fluido de corte à base de emulsões aquosas está relacionado ao desenvolvimento de bactérias e fungos, que podem alterar a composição do produto. Os microrganismos podem causar a deterioração das emulsões, mudando sua viscosidade, aumentando a taxa de corrosão e reduzindo a vida útil das ferramentas que estão em contato com a emulsão (SAHA; DONOFRIO 2012).

Em um estudo realizado no ano de 2012, os autores supracitados, identificaram que os diferentes tipos de metais e a natureza dos fluidos de corte influenciam na composição microbiana da emulsão (SAHA; DONOFRIO 2012). Outra mudança possível é a alteração do pH da emulsão, possibilitando o aumento da corrosão da máquina-ferramenta utilizada para fazer o corte das peças e das próprias peças a serem usinadas (SHOKRANI et al.,2012). Essa alteração diminui o tempo de vida útil do fluido, elevando o número de trocas nas máquinas.

Ao iniciar o processo de usinagem, o fluido de corte pode entrar em processo de vaporização e forma uma névoa com gotículas resultantes da elevação da pressão e da temperatura (SHOKRANI et al., 2012). Essa névoa, além dos componentes do fluido de corte, pode ter toxinas produzidas pelos microrganismos, microrganismos em suspensão (principalmente bactérias e fungos) em sua composição, formando assim um bioaerosol. A inalação desse composto pode ocasionar diversas doenças, como a pneumonite de hipersensibilidade e doenças pulmonares obstrutivas crônicas, assim como doenças respiratórias e de pele (LIU et al., 2012; SHOKRANI et al., 2012; TRAFNY et al., 2015).

Passman (2004) e Saha e Donofrio (2012) afirmam existir uma grande variedade de microrganismos que podem ser encontradas em fluidos de corte: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*; bactérias redutoras de sulfato (SRB), como a *Desulfovibrio spp.* e *Acinetobacter*, agentes patogênicos (oportunistas), tais como *Legionella sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*. Bactérias redutoras de sulfato produzem sulfeto de hidrogênio, uma substância cancerígena que afeta o cérebro, o pulmão e o coração. Bactérias Gram-negativas são responsáveis por produzir toxinas que podem levar a infecções pulmonares adversas.

Entre os grupos de bactérias que podem se desenvolver no fluido de corte, são destacadas as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* - um grupo grande e heterogêneo, formado por bactérias classificadas como Gram-negativas, que se alimentam de matéria orgânica, sendo encontradas no trato intestinal de seres vivos, embora possam ser também encontradas no solo, água, vegetação (GARCIA; RODRIGUEZ, 2010; GUÉRIN, 2015)

Quando seres humanos estão com a imunidade baixa, hospitalizados, em especial aqueles tratados por antibióticos, as bactérias pertencentes a essa família

podem ser encontradas na orofaringe, sistema urogenital e na pele, causando infecções. Bactérias que produzem beta-lactamase têm tido sua resistência aumentada, ou seja, estão se tornando resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos (GARCIA; RODRIGUEZ, 2010).

Garcia e Rodriguez (2010) apresentaram um quadro (QUADRO 1) que resume os locais preferenciais das bactérias mais comuns pertencentes a essa família.

**Quadro 1** - Localização de infecções por *Enterobactérias* mais comuns, enumeradas por ordem de prevalência.

Localização	Enterobactérias mais comuns
Sistema nervoso central	<i>Escherichia</i>
Trato respiratório central	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Corrente sanguínea	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Trato digestivo	<i>Salmonella, Shingella, Escherichia, Yersinia</i>
Trato urinário	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

Fonte: Garcia e Rodriguez (2010)

A *Enterobacter cloacae* possui a forma de bacilo. Pode ser encontrada no hospedeiro sem lhe causar prejuízo, entretanto passa a ser patógena em pacientes que estão com imunidade baixa. Essas bactérias são responsáveis por 7% das infecções de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (GUÉRIN, 2015).

As bactérias do gênero *Proteus* são Gram-negativas e possuem o formato de bacilo. Acometem pacientes com problemas urológicos e anatômicos ou que permanecem durante um longo prazo sob cateterismo, ocasionando infecções do trato urinário. A bactéria causa ainda bacteremia, presença de bactérias no sangue (LIU et al., 2015).

As bactérias da espécie *Escherichia coli* são apontadas como uma das principais causas de doenças infecciosas em seres humanos. Essa espécie de bactéria é conhecida por produzir enterotoxinas, causadoras de doenças como a diarreia, e citotoxinas que estão sendo identificadas principalmente nas infecções urinárias (MATIAS et al., 2011). As infecções causadas por essas bactérias são, em maior parte, oportunistas e acometem pacientes com doenças graves, alojando-se em via gástrica e no trato respiratório, causando, por exemplo, broncopneumonia. A

taxa de mortalidade é elevada: 50% ou mais dos pacientes. Quando encontrada no sistema nervoso central, ela pode causar meningite bacteriana, que atinge principalmente crianças em seus primeiros meses de vida.

As bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter spp.* apresentam-se na forma de bacilos durante sua fase de crescimento rápido e de cocobacilos em sua fase estacionária, são Gram-negativas. Podendo ser encontradas no solo, água, alimentos e na flora normal de animais, as bactérias podem também viver na pele e garganta de indivíduos saudáveis sem causar prejuízos. As *Acinetobacter spp* são saprófitos, ou seja, vivem em matéria orgânica morta ou em decomposição (OLIVEIRA, 2007). Doenças como meningite, infecções do trato urinário, bacteremia e outras diversas infecções podem ser causadas por bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, sendo ela o principal agente de pneumonia hospitalar (CONSTANTINIU et al., 2004).

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* se apresentam na forma de cocos, sendo Gram-positivas. A espécie pode ser encontrada na pele e cavidade nasal de indivíduos considerados saudáveis (SANTOS et al., 2007). A espécie *Staphylococcus aureus* é descrita como uma das mais importantes espécies em relação às infecções hospitalares. Além disso, essa espécie pode ser responsável ainda por intoxicações, sendo o agente etiológico mais comum de infecções purulentas, como: furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite, artrite bacteriana (MATIAS et al., 2011).

É uma bactéria formadora de biofilme: as bactérias aderem a uma superfície, cercadas por uma matriz de polímeros extracelulares autoproduzidos. Isso faz com que o biofilme formado tenha uma alta resistência tanto para antibióticos quanto para o sistema de defesa do hospedeiro, fazendo com que infecções causadas por essas bactérias se tornem mais resistentes e difíceis de tratar. A sua patogenicidade se dá por meio de infecções que danificam a pele, infecções de vias aéreas, osteomielite e mastite (KWIECIŃSKI, 2009).

*Enterococcus faecalis* é uma espécie bacteriana com morfologia de coco, sendo Gram-positiva, com anaeróbia facultativa e formadora de esporos (STUART et al., 2006). Sua ocorrência pode ser isolada, em pares ou em cadeias curtas (JAIN et al., 2016). O gênero *Enterococcus* é encontrado em diversos ambientes, por exemplo: solo, alimentos, água, trato intestinal de seres humanos e animais, podendo causar doenças infecciosas em pacientes que apresentam baixa imunidade



e estão hospitalizados. São isoladas de infecções do trato urinário, infecções intra-abdominais e pélvicas, bacteremias, feridas, infecções teciduais e endocardite como parte de uma flora polimicrobiana (CATALANO et al., 2016).

### 3.4 Biocidas

Segundo Chapman (2003), os biocidas são moléculas orgânicas, inorgânicas ou sintéticas usadas para desinfetar, higienizar ou esterilizar objetos e superfícies. São também utilizadas para preservar materiais ou processos da degradação microbiológica.

São agentes, componentes biorresistentes, utilizados como antimicrobianos incorporados ao fluido de corte com o objetivo de fazer com que não haja crescimento microbiano no sistema. Como são substâncias químicas, entretanto, podem ser perigosas tanto para a saúde dos trabalhadores quanto para o meio ambiente (SHOKRANI et al., 2012). Biocidas são componentes biorresistentes presentes em fluido de corte solúveis, sintéticos e semissintéticos, podem corresponder a até 2% do volume total de fluido (NIOSH, 2001).

Os produtos químicos utilizados como biocidas variam amplamente: cobre, estanho, arseniato de heterociclos orgânicos, como a hidantoínas e isotiazolonas (CHAPMAN, 2003).

Alguns biocidas são compostos por formaldeídos, que é cancerígeno. Tris(hidroximetil)nitrometano e hexahydro-1,3,5, e o tris(2-hidroxietil)-s-triazina são exemplos de agentes antimicrobianos que podem se transformar em formaldeído, esse composto químico pode ser um agente irritante das vias aéreas e ocasiona asma ocupacional, podendo causar ainda dermatite de contato alérgica (NIOSH, 2001).

Manter a concentração de biocidas em sistemas nos quais há circulação de líquidos é uma questão problemática, devido à evaporação da água durante o processo de arrefecimento. Quando o volume de fluido de corte no reservatório é repostado, não são realizados testes para verificar a quantidade de biocidas que devem ser incorporados ao sistema novamente, levando a uma concentração elevada desses produtos, o que pode afetar a saúde dos trabalhadores, (TRAFNY et al., 2015).

De acordo com Shokrani et al. (2012), alguns agentes antimicrobianos e biocidas estão sendo utilizados com o propósito de manter a funcionalidade dos fluidos de corte e não com o objetivo de fazer a proteção dos trabalhadores no combate aos microrganismos.

### 3.5 Óleos essenciais

De acordo com Silva et al. (2009) e Stefanakis et al. (2013), óleos essenciais são substâncias presentes em diversas espécies de plantas, podendo estar presente em cascas, raízes, flores, sementes. Essas substâncias são produto resultante do metabolismo secundário das plantas e têm por função auxiliar na sua sobrevivência. A composição química dessas substâncias varia conforme os fatores ambientais, a ação climática, a idade da planta, a ação de predadores. A atividade antimicrobiana de um óleo essencial depende da composição, concentração, forma de armazenamento e do tipo de microrganismo a ser testado.

Segundo Stefanakis e colaboradores (2013), os óleos essenciais exercem o papel de protetores em plantas, apresentando características antibacterianas, antivirais, inseticidas. Existem mais de 3.000 óleos conhecidos, porém aproximadamente 300 são comercializados. Sendo compostos de hidrocarbonetos (principalmente terpenóides) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres de fenol). Eles podem ser empregados em indústrias farmacêuticas, cosméticas, alimentícias, de bebidas e ainda como aditivos antimicrobianos.

Segundo Shokoohi et al. (2015), nos últimos anos, devido à ocorrência de diversos tipos de doenças, estudos sobre a eficácia de óleos essenciais estão sendo realizados. De acordo com os levantamentos realizados pelos autores supracitados, os óleos essenciais de tomilho, cravo e canela são os que têm as melhores características antimicrobianas.

Para Pandey et al. (2014), o gênero *Ocimum* (alfavaca) é composto por cerca de 150 espécies e é amplamente distribuído por diversas regiões pelo mundo. Espécies como *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum sanctum* são frequentemente cultivadas em países da Ásia, Europa, América e na Austrália.

O principal composto presente na planta *Ocimum gratissimum* (Figura 1) é o composto Eugenol. Seu percentual pode variar em função da técnica de extração do óleo da planta. Esse composto apresenta uma série de propriedades: agente aromático para alimentos, anestésico dentário, antibactericida e fungicida (PASSOS, 2009). A planta é composta ainda por substâncias ativas, como: fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides e fenilpropanoides. O estudo da cromatografia gasosa e o espectro de massas do óleo essencial apresenta 14 compostos, sendo os principais: Eugenol (43,7%) e 1,8- Cineol (32,71%). Outros constituintes menores foram:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, Cis-ocimeno, linalol,  $\alpha$ -terpineol,  $p$ -elemeno, trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, Germacrene-D,  $\alpha$ -selineno e  $\beta$ -selineno (UPADHYAY; BHAGWAT, 2014).

**Figura 1** – Folhas de *Ocimum gratissimum*.



**Fonte:** <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/alfavaca/>

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* foi observada em relação a diversos microrganismos patogênicos, por exemplo: *S. aureus*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Leishmania amazonensis* (MATIAS et al., 2011; PANDEY et al., 2014), *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, leveduras como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e fungos dermatófilos, como *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (NAKAMURA et al., 2006).

O *Ocimum gratissimum* é utilizado para o tratamento de diversos tipos de doenças, como a leishmaniose, infecções de trato respiratório superior, diarreia, febre tifoide, doenças de pele e oftalmológicas (PASSOS, 2009; PRASANNABALAJI et al., 2012; UPADHYAY; BHAGWAT, 2014).

A *Carapa guianeses*, conhecida popularmente como andiroba, é uma árvore da família do mogno e do cedro, bastante resistente ao ataque de insetos. Uma árvore adulta produz cerca de 120 kg de sementes (Figura 2). No método de extração artesanal do óleo, 12 kg de sementes rendem 10 litros de óleo; na extração industrial, é preciso apenas 4 kg de sementes para extrair 30 litros de óleo (MORAIS, 2012).

A andiroba é uma árvore de usos múltiplos, a sua madeira pode ser utilizada tanto na construção civil como na fabricação de móveis, suas sementes são utilizadas para a extração do óleo. Ela é de fundamental importância tanto para a economia regional do norte do Brasil quanto para a comunidade, pois seu óleo é utilizado na medicina popular. Por não causar prejuízos às florestas, a extração dos óleos de sementes é uma opção para o crescimento econômico da região (MENDONÇA; FERRAZ, 2007). O óleo de andiroba é composto por ácidos gordurosos, por exemplo, o oleico, palmítico, mirístico e ácido linoleico, contendo ainda componentes não graxos como triterpenos, taninos e alcaloides isolados, como a andirobina e carapina (MORAIS, 2012).

**Figura 2 – Sementes de *Carapa guianeses***



Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/897001/semente-de-andiroba>

Os óleos provenientes das sementes têm propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antissépticas e inseticidas, podendo ser utilizados na indústria cosmética e na preparação de sabões (SOUZA, 2006; FERRAZ, 2002). O óleo possui um sabor amargo que é atribuído a um grupo de terpenos chamados de meliacinas, com propriedades antiparasíticas e antimaláricas de efeito semelhante à quinina.

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela - Figura 3) apresenta atividade antioxidante e antibacteriana (ANDRADE et al., 2012). Possui substâncias ativas, como componentes majoritários: os monoterpenos acíclicos, citronelal (47,12%), geraniol (18,56%) e citronelol (11,07%). Este último tem por característica ser um bom aromatizante, repelente de insetos e possuir propriedades antimicrobianas (MARCO et al., 2006).

**Figura 3** – Folhas de *Cymbopogon winterianus*



Fonte: <http://www.remedio-caseiro.com/citronela-beneficios-e-propriedades/>

Silveira et al. (2012) testaram diferentes óleos essenciais em diferentes tipos de bactérias. O óleo de citronela, um dos testados, formou os maiores halos nas espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereuse*, *Bacillus subtilis*. A atividade do óleo foi semelhante ao antibiótico ampicilina para a bactéria

*Staphylococcus aureus* e semelhante aos antibióticos cloranfenicol e ampicilina para *L. monocytogenes*. Além disso, o óleo apresentou uma atividade diferenciada em relação às espécies de *Bacillus*, superior a antibióticos.

A *Syzygium aromaticum* (*S. aromaticum* - Figura 4), cujo sinônimo é *Eugenia caryophyllata*, é conhecida popularmente como cravo-da-índia. Tem tamanho mediano (8-12 m) e pertence à família Mirtaceae, nativa das ilhas Maluku no leste da Indonésia. O cravo-da-índia tem em sua composição compostos fenólicos como flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxifenilpropenos.

Seu principal componente ativo é o Eugenol, que compõe cerca de 89% do óleo essencial de cravo. O acetato de eugenol e o  $\beta$ -cariofileno compõem de 5% a 15%. Outro composto importante encontrado no óleo essencial de cravo, em concentrações de até 2,1%, é  $\alpha$ -humulen. Existem ainda outros compostos voláteis encontrados em concentrações menores: o p-pineno, o limoneno, o farnesol, o benzaldeído, a 2-heptanona e o hexanoato de etilo (CORTÉS-RAJA et al., 2014).

**Figura 4-** Botões de flores secas e flores de *Syzygium aromaticum*



Fonte: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Syzygium+aromaticum>

Devido a sua composição, o cravo-da-índia é uma planta de uso medicinal, possuindo atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antinociceptivo, antimutagênico e anticarcinogênico (AJIBOYE et al. 2015; RUY et al. 2016).

Devi et al. (2010) analisaram a atividade antibacteriana do Eugenol e seu mecanismo de ação bactericida em relação à bactéria *Salmonella typhi*, utilizando o método de disco-difusão. Os autores obtiveram inibição completa da bactéria a partir da concentração de 0,0125% de Eugenol (DEVI et al., 2010). Moon et al. (2011) fizeram estudo do sinergismo do óleo de cravo além de seus componentes em relação a bactérias provenientes da mucosa bucal.

### 3.6 Encapsulamento

Os óleos essenciais são substâncias orgânicas e naturais presentes nas plantas, porém essas substâncias são muito voláteis, o que ocasiona, ao longo do tempo, a diminuição da sua eficiência por perda. Devido a isso, não é possível fazer um controle da sua duração nos sistemas em que os óleos essenciais são utilizados, pois sua duração pode ser curta. O micro encapsulamento ou microesferificação foi uma forma criada com o objetivo de aumentar a “vida útil” dos óleos essenciais nos sistemas em que são utilizados e fazer com que a sua liberação ocorresse de forma gradativa, isso devido à formação de uma cobertura polimérica ao redor do óleo essencial (BENAVIDES et al., 2016).

As microcápsulas servem de proteção para os óleos essenciais, já que eles não estão em contato direto com fatores ambientais. Por meio delas também é possível fazer o controle da liberação dos óleos, aumentando a concentração deles no sistema por mais tempo, o que pode auxiliar no efeito antimicrobiano que os óleos essenciais possuem. O microencapsulamento pode ser aplicado com o objetivo de analisar as propriedades dos óleos. Existem vários métodos para realização desse processo (HOLKEM et al., 2015; BENAVIDES et al., 2016). Benavides et al. (2016) apontaram a gelificação iônica como um método simples e versátil para alcançar o objetivo de encapsular óleos essenciais.

A gelificação iônica pode ser definida como “processo químico baseado em interações iônicas entre polímeros com carga oposta” (BENAVIDES et al., 2016). O material mais utilizado é o alginato, produto extraído de algas, por ser um polímero aniônico, ou seja, é um produto de origem natural. O alginato é composto basicamente de: 1-4bD-mannurônico (M) e a-L-gulurônico (G), sendo um produto de

baixo custo e não tóxico. As microesferas produzidas no processo de gelificação iônica formam uma emulsão com o óleo essencial, que é gotejada em uma solução de cálcio (BENAVIDES et al., 2016).

O encapsulamento dos óleos essenciais pode ser feito de diferentes formas. No trabalho desenvolvido por Ascheri et al (2003), os autores fizeram a comparação dos diferentes materiais usados no encapsulamento do óleo essencial da casca da laranja. Leimann (2008) e Moreira (2014) utilizaram a coacervação em seus trabalhos sobre encapsulamento de óleos essenciais.

### 3.7 Concentração mínima inibitória e sensibilidade de agentes antimicrobianos

De acordo com a Anvisa (2008), os testes realizados para analisar a sensibilidade de um microrganismo em relação a um determinado antimicrobiano é avaliado pela concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, é a menor concentração na qual um antimicrobiano promove a inibição de crescimento visível de microrganismo. Existem diferentes tipos de metodologias capazes de avaliar a CMI dos agentes antimicrobianos: diluição em Agar (SILVA et al., 2009), difusão em Agar (PEREIRA et al., 2008), microdiluição (SILVEIRA, 2012), disco-difusão (OSTROSKY et al., 2008).

O teste de disco-difusão é utilizado para avaliar a sensibilidade de um microrganismo em relação a um agente. O método consiste em impregnar o disco de papel de filtro com um tamanho pré-determinado e depositá-lo sobre uma placa de Petri previamente inoculada com os microrganismos. O resultado da sensibilidade é analisado observando-se a formação de um halo ao redor do disco de papel. Quanto maior o halo formado maior será a eficiência do agente antimicrobiano (ANVISA, 2008; SILVA et al., 2014), sendo possível definir quais os graus de resistência dos microrganismos aos antibióticos, se eles são resistentes, de resultado intermediário ou sensíveis. Esse teste é classificado como qualitativo (ANVISA, 2008).

Silva et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas em relação as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores utilizaram os óleos essenciais de alecrim, cravo, gengibre, capim cidreira, hortelã pimenta e canela. A metodologia utilizada pelos autores foi diluição em Agar,



que consiste na diluição direta do óleo essencial ao meio de cultura com ajuda de um solvente, no caso, os autores utilizaram 0,2% de TWEEN 80. Além de avaliar o crescimento bacteriano com os óleos, em função do tempo e a curva de sobrevivência, os autores estudaram diferentes concentrações dos óleos.

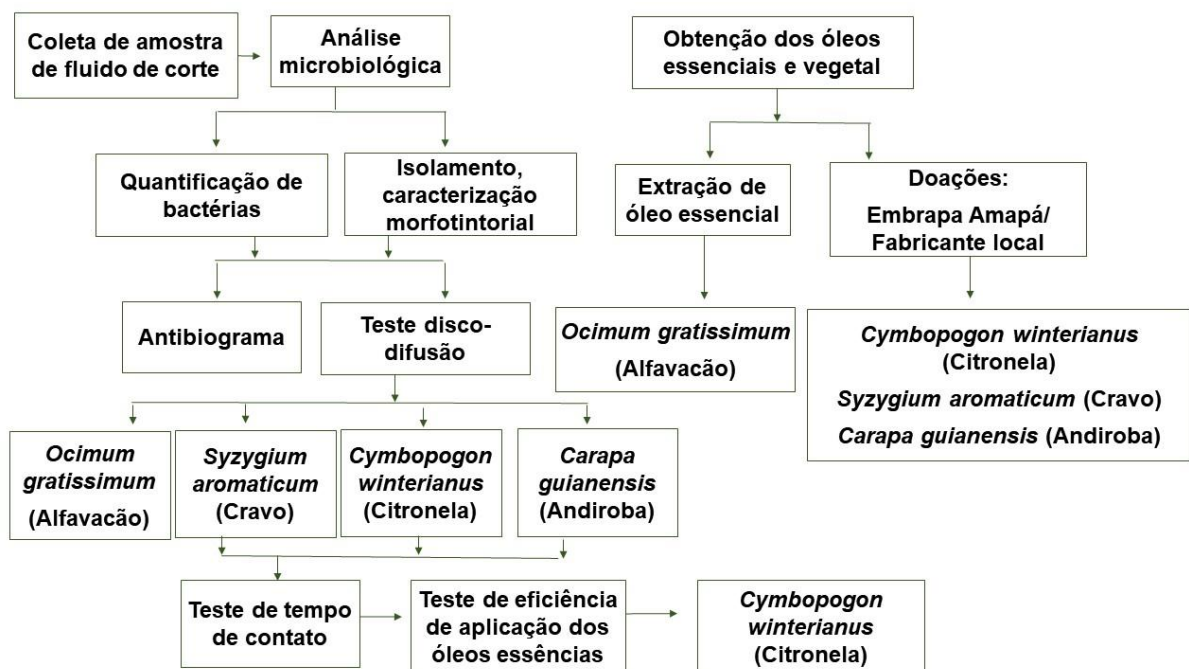
Pereira et al. (2008) estudaram o efeito inibitório de óleos essenciais e o crescimento de bactérias e fungos utilizando os óleos essenciais de cravo da índia, orégano e capim limão. Para isso, os autores aplicaram a metodologia de difusão em Agar, fazendo ainda a combinação dos óleos essenciais, chamado de sinergismo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, serão descritas as metodologias utilizadas para a avaliação da eficiência dos óleos essenciais e vegetal no controle de bactérias encontradas no fluido de corte utilizado durante o processo de usinagem.

Na Figura 5, pode-se observar o fluxograma contendo as etapas que foram desenvolvidas nesta pesquisa.

**Figura 5**-Fluxograma contendo as atividades executadas nas diferentes etapas da pesquisa.



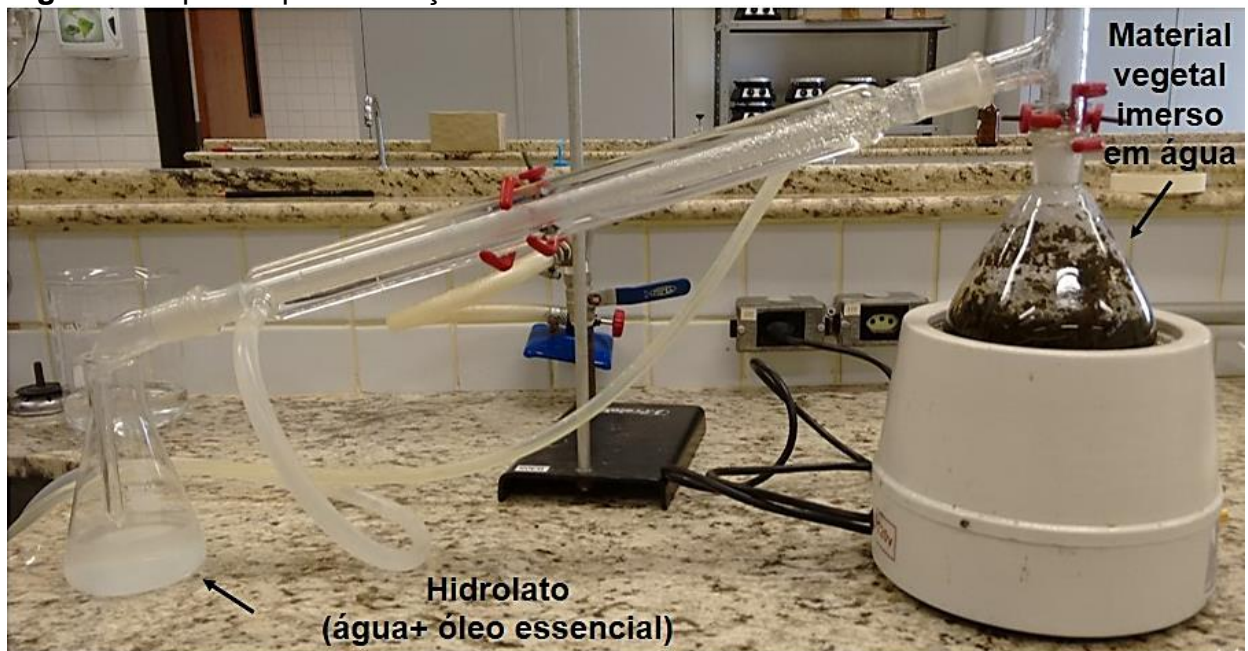
Fonte: autoria própria

### 4.1 Extração de óleo essencial por arraste a vapor

A extração de óleo essencial teve por finalidade obter um produto puro, livre de qualquer outro composto associado, para que pudesse ser utilizado nos testes. A

extração da espécie *Ocimum basilicum*, conhecida popularmente como alfavacão, foi realizada no Laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A metodologia utilizada foi a de arraste a vapor d'água, que consiste em colocar as folhas secas e trituradas (30 g) em balão de fundo redondo de 1000 mL e em seguida adicionar um volume de água no qual o material vegetal fique imerso. Após esse procedimento, o balão foi colocado em uma manta aquecedora acoplada a um condensador, por onde passava água constantemente. À medida em que a água com material vegetal passava para o estado de vapor, o hidrolato (água e óleo essencial) era recolhido em um erlenmeyer de 250 mL (Figura 6).

**Figura 6** - Aparato para extração de óleo essencial



Fonte: autoria própria

O hidrolato obtido foi submetido à extração com solvente hexano, utilizando funil de separação, no qual o óleo presente na água foi misturado por afinidade ao solvente, formando assim duas fases no funil de separação. A água foi posteriormente descartada e o solvente, contendo o óleo, foi submetido à filtração com o auxílio de sulfato de magnésio anidro para a absorção da água que poderia ter restado na mistura. Em seguida, o solvente foi separado do óleo essencial sob pressão reduzida em vapor rotativo, sendo o solvente recuperado no final do

processo. O óleo extraído foi transferido para frascos de vidro hermeticamente fechados para posterior utilização.

De um total de 1.000 g de folhas secas e trituradas, foi obtido um volume de 7 mL de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), sendo que, para a utilização nos diferentes testes, foram realizadas diluições desse óleo, obtendo a concentração de 0,25%; 0,5%; 1,0% e 1,5%. A diluição foi feita com solvente orgânico etanol.

O óleo vegetal de *Carapa guianensis* (andiroba) foi doado pela Embrapa Amapá. Ele é obtido das sementes localizadas no ouriço da planta. Estas passam por processo de cozimento e depois são maceradas para a extração do óleo. O processo ocorre de forma artesanal, obtém-se o óleo na forma pura, ou seja, sem adição de outros compostos.

#### 4.2 Soluções estoque de óleos essenciais

Foram preparadas soluções estoques dos óleos essenciais e vegetal para uso durante os procedimentos de cada metodologia a ser executada.

Para cada óleo usado, foi preparada uma solução estoque em que o volume final seria de 5 mL na concentração de 10% e a partir desse estoque as demais diluições foram realizadas (0,5 mL de óleo essencial puro para 4,5 mL de etanol - solvente utilizado para diluição dos óleos).

#### 4.3 Coleta de amostras de fluido de corte

A máquina na qual as coletas das amostras de fluido de corte foram realizadas é um centro de usinagem HELLER MCi 25 (Figura 7), pertencente a uma empresa que atua na área de metalomecânica, localizada no município de Cambé (PR). Ela fornece produtos manufaturados para indústrias automobilísticas e o fluido de corte utilizado é de origem vegetal, solúvel em água, contendo aditivos.

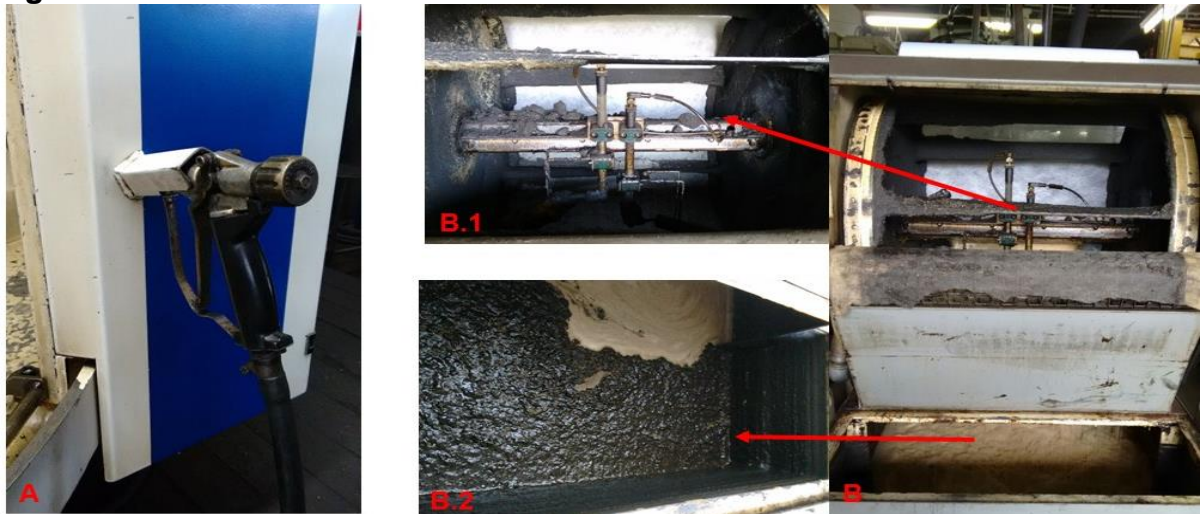
**Figura 7** - Máquina utilizada para coleta de fluido de corte, centro de usinagem HELLER MCI25.



Fonte: autoria própria

Foram realizadas duas coletas de fluido de corte para amostragem de material. Na primeira coleta, foram retirados cerca de 500 mL de fluido de corte já usinado presente na máquina-ferramenta, sendo 250 mL da pistola da máquina e 250 mL do reservatório do fluido (Figura 8). Na segunda coleta, foram coletados cerca de 400 mL de fluido de corte do reservatório. As coletas foram realizadas no período da manhã. O fluido de corte estava na máquina há pelo menos cinco meses, auxiliando no processo de usinagem. As amostras foram coletadas com materiais esterilizados e mantidas sob refrigeração com temperatura inferior a 10°C durante o transporte até o laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

**Figura 8 - Locais de coleta do fluido de corte**



Fonte: autoria própria

Legenda - A- Pistola do centro de usinagem por onde o fluido é utilizado pelo operador; B- Tanque de armazenamento do fluido de corte; B1- Parte superior do tanque de armazenamento do fluido de corte, onde tem a parte de filtração dos cavacos finos; B2 - Visão inferior do tanque de armazenamento do fluido de corte na máquina centro de usinagem.

#### 4.4 Análise microbiológica

As análises microbiológicas realizadas tinham por objetivo a quantificação de bactérias heterotróficas, potencialmente patogênicas e identificação de isolados de bactérias potencialmente patogênicas presentes no fluido de corte.

##### 4.4.1 Quantificação de bactérias

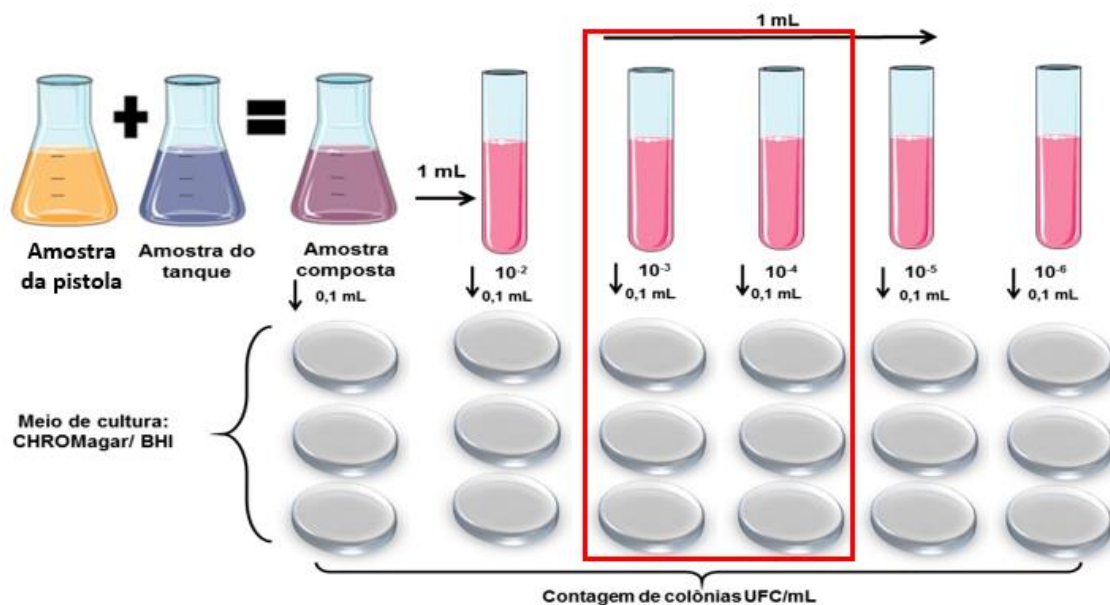
Para o procedimento de quantificação foram utilizados os meios de cultura *Brain Heart Infusion Agar* – BHI (HIMEDIA) para bactérias heterotróficas e BD Difco *CHROMagar Orientation* para bactérias potencialmente patogênicas.

Para realização do procedimento de quantificação, 10 mL de amostra de fluido de corte proveniente da pistola do centro de usinagem e 10 mL do tanque de armazenamento do fluido foram homogeneizadas e dessa amostra composta retirou-se uma alíquota de 10 mL que foi inserida em um erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina a 0,8%, obtendo-se assim a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). Posteriormente,

foram realizadas diluições seriadas, colocando-se 1 mL da amostra em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina até a obtenção da diluição de  $10^{-6}$ .

Após esse procedimento, foi realizado o método de espalhamento em placa, no qual uma alíquota de 0,1 mL da diluição era espalhada com auxílio de *Swab* na superfície do meio de cultura presente nas placas de Petri. Foram utilizadas para esse procedimento a amostra composta e as diluições de  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para o meio de cultura BHI e para o meio de cultura CHROMagar (Figura 9). Os procedimentos foram realizados em triplicata para os dois meios de cultura utilizados. Devido às características do meio de cultura seletivo CHROMagar, durante a sua preparação e período de incubação das bactérias, as placas foram envoltas em papel alumínio para evitar o contato com a luz, uma vez que sua exposição poderia comprometer os cromogênios presentes. Os meios foram incubados por 24 horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  para os meios de cultura BHI e CHROMagar *Orientation*.

**Figura 9** - Representação esquemática da metodologia para contagem de colônias de bactérias.



Fonte: autoria própria

Após o período de incubação, realizou-se a contagem de colônias presentes em cada placa de Petri. O cálculo do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de fluido foi realizado utilizando a fórmula a seguir:

$$UFC = (\text{número de colônias}) \times 10^* \times (\text{diluição utilizada para contagem})$$

10\*fator de correção: neste caso, multiplica-se por 10 em função da utilização de 0,1 mL de amostra.

#### 4.4.2 Isolamento e caracterização morfotintorial

Para o procedimento de isolamento, foram selecionadas as bactérias que cresceram no meio CHROMagar *Orientation* uma vez que os testes de disco-difusão, tempo de contato e teste de encapsulamento seriam realizados com esse grupo de bactérias. As colônias foram selecionadas por meio da identificação da coloração, seguindo informações da Ficha Técnica do Produto BD *Difco CHROMagar Orientation Medium* (2011), como pode ser observado no Quadro 2.

**Quadro 2** - Classificação e características das colônias bacterianas que crescem em meio BD CHROMagar *Orientation Medium*.

Estirpes	Resultados de crescimento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescimento bom a excelente; colônias transparentes, rosa escuro a vermelho claro, de tamanho médio a grande
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Crescimento bom a excelente; colônias de tamanho médio, azul forte, com ou sem halos violetas
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	Crescimento bom a excelente, colônias de tamanho médio, tonalidade pálida a bege, envoltas num halo de cor âmbar a castanho; nas áreas de crescimento denso, o meio pode apresentar-se completamente âmbar a castanho. Inibição parcial a completa da proliferação.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crescimento bom a excelente; colônias pequenas, azul-esverdeado a azul
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Crescimento razoável a bom; colônias de tamanho diminuto a pequeno, azul-esverdeado claro a azul claro, com ou sem halos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crescimento bom a excelente; colônias de dimensão média a pequena, com a sua cor natural (branco a creme)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 (=NCTC 10516)	Crescimento razoável a bom; colônias pequenas, opacas, vermelho claro a cor-de-rosa
Não inoculadas	Incolor a âmbar muito claro, transparente

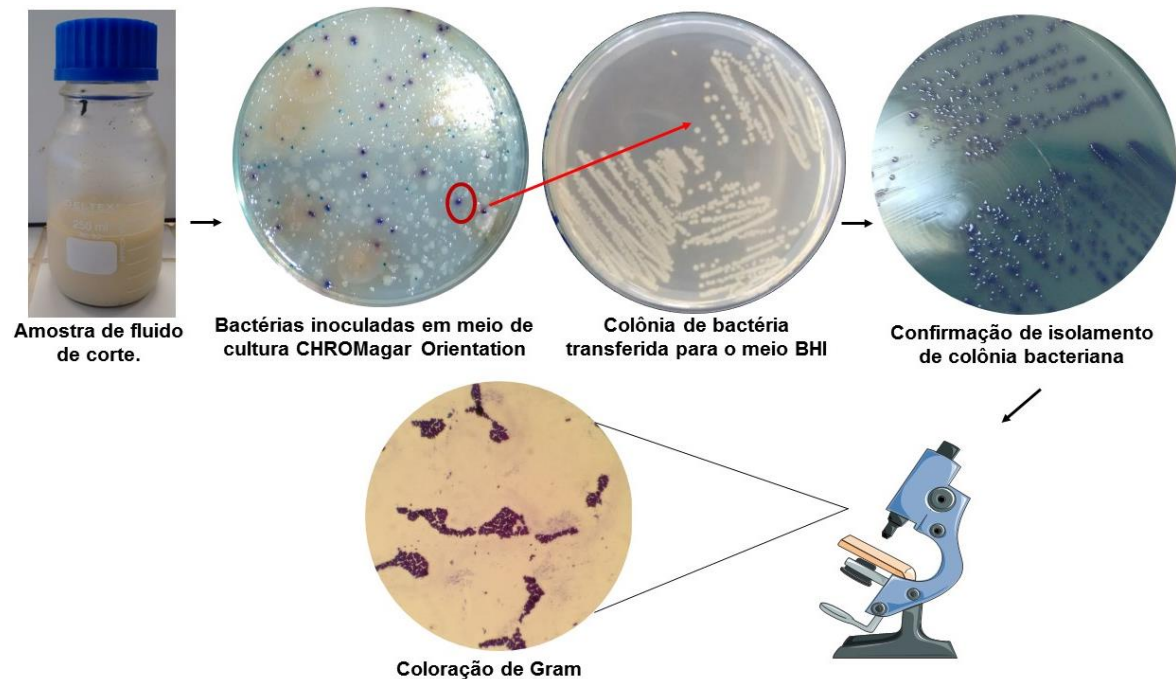
Fonte: Ficha Técnica do Produto do BD CHROMagar *Orientation Medium*, 2011.



Para o isolamento das bactérias potencialmente patogênicas em culturas puras, foi realizado o procedimento de esgotamento em placa de Petri, contendo meio de cultura BHI (24 horas  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Selecionou-se as colônias em função das diferentes colorações que apareceram nas placas de Petri contendo o meio CHROMagar *Orientation*. Após o período de incubação, as bactérias isoladas foram novamente transferidas para o meio CHROMagar para confirmação de coloração e isolamento.

As colônias isoladas foram posteriormente submetidas à caracterização morfológica, para avaliação de morfologia e resposta à coloração de Gram (Figura 10). Após a obtenção e caracterização de cultura pura, as bactérias foram estocadas em meio de cultura BHI com 15% de glicerol a uma temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ .

**Figura 10** - Representação esquemática do isolamento de bactérias e caracterização morfológica



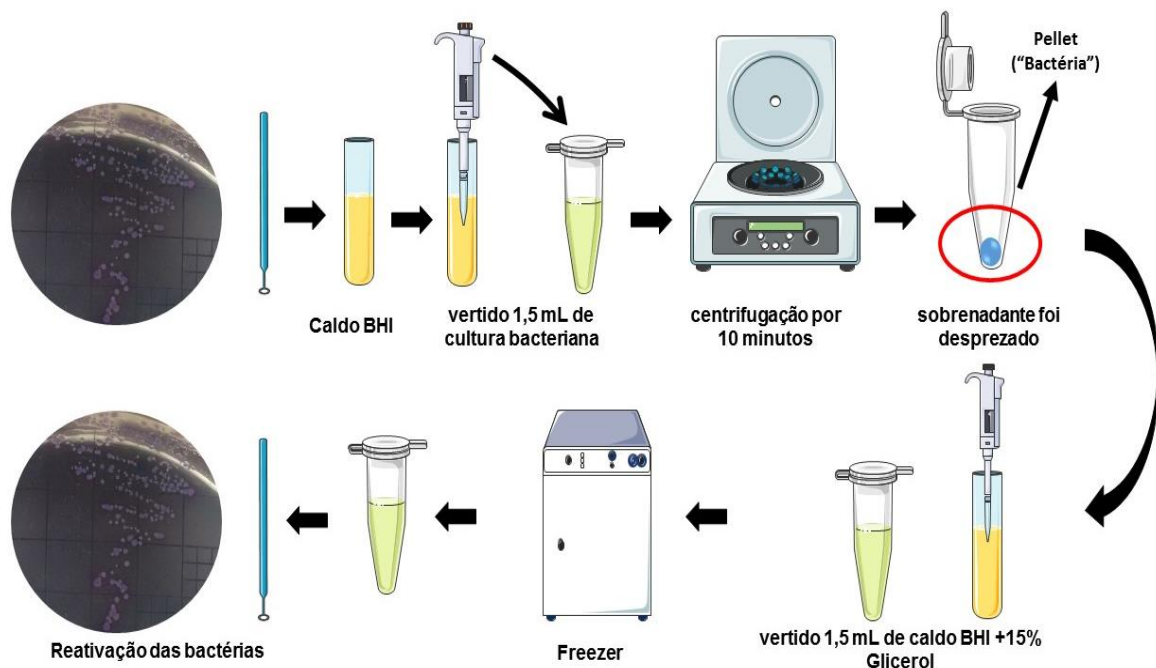
Fonte: autoria própria

#### 4.4.3 Preparação de estoque de cultura bacteriana

O estoque bacteriano foi preparado para manutenção das bactérias isoladas do fluido de corte coletado para a realização de testes posteriores.

As bactérias previamente isoladas foram inoculadas em meio de cultura HIMEDIA *Brain Heart Infusion Broth* – caldo BHI para crescimento por um período de 24 h a uma temperatura de 35°C, em seguida foi vertido 1,5 mL de cultura bacteriana em tubo de microcentrífuga - *ependorf* por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* depositado no fundo do *ependorf* foi suspenso, sendo adicionado 1,5mL de caldo BHI com 15% de glicerol e depois submetido a congelamento. Para análise de viabilidade do estoque bacteriano, foi realizado o processo de descongelamento do estoque e inoculando em placa contendo meio de cultura BHI e levado para incubação por 24 horas. O glicerol é utilizado como um agente protetor para a conservação de bactérias (Figura 11).

**Figura 11** - Representação esquemática da preparação do estoque das culturas bacterianas



Fonte: autoria própria

#### 4.4.4 Escala *Mcfarland*

Para os testes de antibiograma, disco-difusão e tempo de contato foi realizada a padronização da concentração de bactérias por meio da metodologia da Escala *Mcfarland*. A partir dos estoques descritos anteriormente, para sua reativação, as bactérias foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura BHI por 24 horas a 35°C. Em seguida, com um auxílio de uma alça bacteriológica, as colônias bacterianas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina até que se atingisse o nível de turbidez de uma solução *Mcfarland* 0,5. Essa turbidez corresponde a  $1,5 \times 10^8$  células por mL. (Figura 12)

Esse procedimento foi realizado com os 6 grupos de bactérias potencialmente patogênicas provenientes dos estoques (item 4.4.3).

**Figura 12** - Comparação da turbidez da suspensão bacteriana preparada com o padrão de turbidez de 0,5 da Escala *McFarland*.



Fonte: <http://microbeonline.com/wp-content/uploads/2016/06/kirby-bauer-antibiotic-sensitivity-testing-9-728-343x187.jpg>

#### 4.4.5 Antibiograma

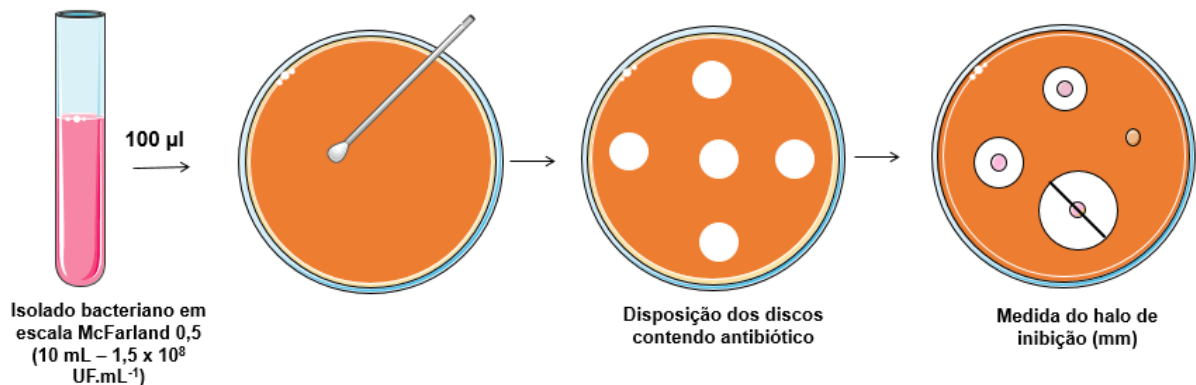
Antibiograma é um teste *in vitro* de avaliação da sensibilidade de uma determinada linhagem de bactéria frente a diferentes antibióticos. Essa metodologia foi proposta com o objetivo de testar a resistência das bactérias isoladas do fluido de corte em relação a alguns antibióticos.

Para a realização dos testes, as placas de Petri, contendo meio de cultura ágar *Muller Hinton* (Fluka - *Analytical* – sigma Aldrich), e os frascos com os discos de antibióticos foram colocados á temperatura ambiente antecipadamente por cerca de 20 a 30 minutos para se equilibrarem antes da manipulação, conforme orientação de CLSI (2013). As culturas bacterianas, após 24 horas de incubação, foram padronizadas na escala *McFarland* 0,5 (item 4.4.4), sendo inoculados 100 µL e espalhadas sobre a placa de Petri com auxílio de *swab*. Na transferência dos discos com antibiótico para as placas de Petri já inoculadas, foi utilizada uma pinça esterilizada. Foram distribuídos quatro discos de diferentes antibióticos. Os antibióticos utilizados durante o teste foram: Ciprofloxacina (cip 05 µg), Sulfametoxazol/Trimetoprim - Sulfazotrim (sut 25 µg), Gentamicina (gen 10 µg), Amoxicilina (amo 10 µg), Vancomicina (van 30 µg), Cloranfenicol (clo 30 µg), Cefalotina (cfl 30 µg), Doxiciclina (Dox 30 µg), Amoxicilina/Ácido Clavulânico (amc 30 µg).

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (18 a 24 horas 35 ±1°C, conforme indicação de cada antibiótico), segundo CLSI (2013).

Após o tempo de inoculação, foram medidos, com auxílio de régua, os diâmetros dos halos inibitórios, formados ao redor de cada disco (Figura 13). De acordo com o tamanho dos halos foi possível determinar se a bactéria era sensível, intermediária ou resistente aos antibióticos testados, comparando informações de sensibilidade a antibióticos conforme instruções de CLSI (2013).

**Figura 13-** Diagrama do teste de sensibilidade a antibiótico (antibiograma) e medida em milímetros do halo de inibição ao redor dos discos contendo antibiótico.



Fonte: autoria própria

#### 4.5 Teste disco-difusão

Com o intuito de determinar a concentração mínima para a inibição do crescimento bacteriano foi realizado o teste de disco-difusão, que seguiu o mesmo princípio do antibiograma (item 4.4.5). O que diferencia os métodos é o produto utilizado para fazer o processo de inibição do crescimento das bactérias.

As bactérias foram submetidas a concentrações de: 0,25%, 0,5%, 1,0 % e 1,5% de óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Syzygium aromaticum* (cravo) e óleo vegetal de *Carapa guianensis* (andiroba).

Para a realização do teste, realizou-se a semeadura de 100 uL da solução contendo as bactérias padronizadas na escala *McFarland* 0,5 (item 4.4.4) em placas de Petri com meio de cultura *Müller Hinton*. Em seguida, foi realizada a distribuição dos discos de 5 mm de diâmetro contendo 5uL de óleo essencial nas concentrações em estudo e disco contendo 5uL do solvente etanol (100%), para se avaliar o efeito deste na inibição do crescimento das bactérias.

Para análise dos resultados, o valor do halo formado pelo solvente etanol foi descontado do halo formado pelos óleos essenciais. Foram realizados o monitoramento e o controle de crescimento microbiológico positivo e negativo, mantendo as placas nas mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade. No controle positivo, as placas foram inoculadas apenas com as

bactérias a serem estudadas e, no controle negativo, não houve inoculação bacteriana para confirmar a esterilização do meio de cultura. O teste foi realizado em triplicata e as placas de Petri foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24 horas. Os halos que se formaram ao redor do disco de papel de filtro (medidos em mm) indicaram a sensibilidade da bactéria aos óleos testados.

#### 4.6 Teste de tempo de contato das bactérias sensíveis aos óleos essenciais

O teste de tempo de contato foi realizado para se analisar o menor tempo em que ocorre a inibição bacteriana em relação aos óleos essenciais. Foram testados os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon winterianus* (citronela) *Syzygium aromaticum* (cravo) na concentração de 0,25% (menor concentração dos óleos essenciais e vegetais em que a inibição bacteriana ocorreu).

A metodologia utilizada nesse teste foi baseada em Ferreira (2015) e Pinto (2015). Para esse procedimento, as bactérias isoladas foram enriquecidas no meio de cultura caldo BHI, semeadas em meio de cultura BHI sólido e incubadas por um período de 24 horas em estufa bacteriológica, em seguida os inóculos bacterianos foram padronizados pela escala *McFarland*.

Foi preparada uma solução para realização do teste contendo 0,2 mL de óleo essencial e 0,6 mL de solução salina, transferidas para tubo de ensaio estéril. Em seguida, 1,2 mL de solução bacteriana, padronizada por meio da escala *McFarland*, foi transferida para tubos de ensaio contendo a solução preparada anteriormente. O volume final do tubo de ensaio continha um volume de 2 mL com concentração final de 0,25% de óleo essencial.

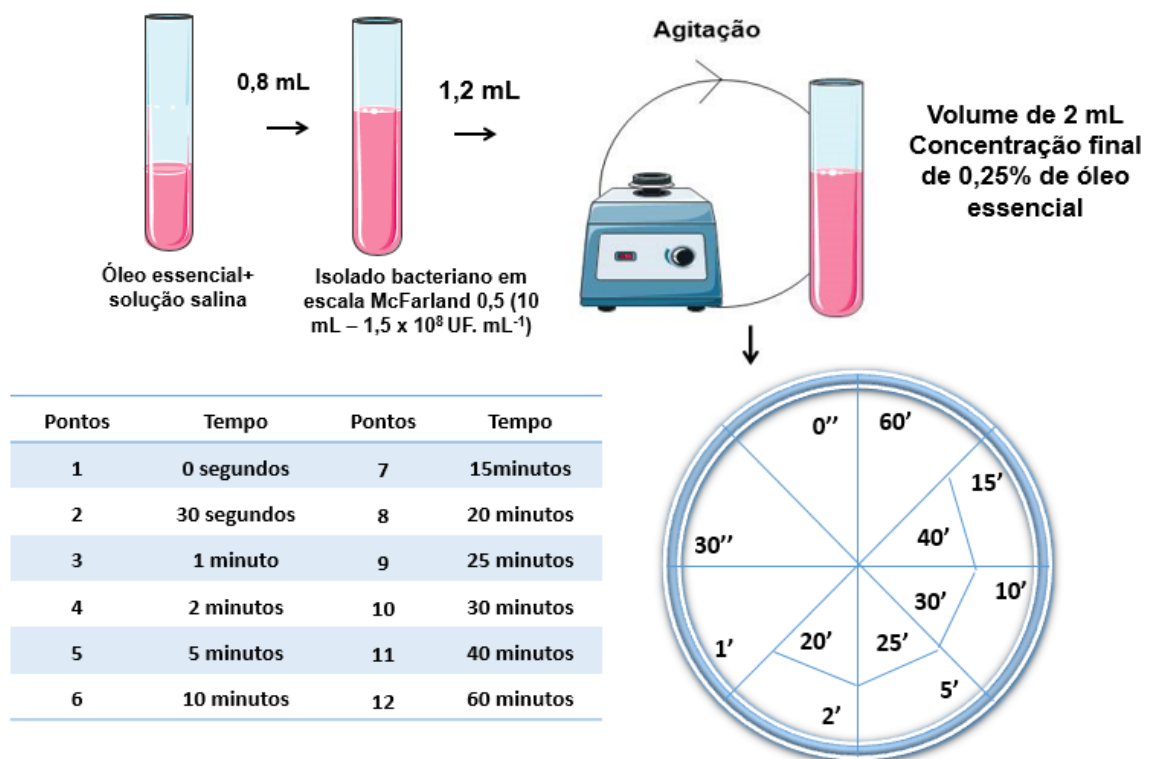
Ao inocular as bactérias no tubo de ensaio, foi iniciada a contagem do tempo em que o agente inibidor ficou em contato com as bactérias, sendo que, nos tempos determinados, uma alíquota de 5 $\mu\text{L}$  foi retirada e gotejada nas placas de Petri, nos espaços determinados, conforme representado na Figura 14, contendo meio de cultura BHI para análise de crescimento bacteriano.

Nos primeiros 5 minutos de avaliação do tempo de contato das bactérias com o óleo essencial testado, os tubos de ensaio foram homogeneizados com auxílio de vortex e o restante dos tempos em que ocorreu o contato das bactérias com a

solução os tubos foram homogeneizados em incubadora *shaker*. Os tempos de contato estudados foram de 0, 30 segundos, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 60 minutos.

Os testes foram realizados em triplicata e executados os controles de crescimento positivo e negativo, como descrito no item 4.5. As placas de Petri foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}\pm 1$  por 24 horas.

**Figura 14** - Representação esquemática do teste de tempo de contato das bactérias com os óleos essenciais.



Fonte: autoria própria

#### 4.7 Preparação do fluido de corte para teste de encapsulamento de óleo essencial por gelificação iônica

Para a realização do teste de encapsulamento, foi preparado um fluido de corte de base vegetal no laboratório - com o objetivo de que não houvesse interferência de biocidas que já vêm adicionados à formulação de fluidos provenientes das fábricas. Foi utilizada a proporção de 8% de fluido de corte

composto de óleo vegetal de pinhão manso e emulsificantes para cada 1000 mL de água corrente. Foram preparados 4 litros de fluido de corte.

Após a preparação do fluido sem adição de biocidas, foi feito o processo de contaminação para a realização do teste de encapsulamento. Em primeiro lugar, a contaminação do fluido de corte feito em laboratório ocorreu adicionando-se 20 mL do fluido de corte proveniente de uma máquina-ferramenta (coleta descrita no item 4.3), em 1000 mL do fluido de corte preparado no laboratório. Após esse procedimento, foi feito o acompanhamento do crescimento das bactérias durante o período de 7 dias, por meio da inoculação de 100 µL do fluido de corte em placas de Petri contendo meio de cultura BHI, e incubadas por 24 horas a 35°C, para verificar se elas cresceram no fluido de corte para assim dar início ao teste. O fluido de corte que havia sido contaminado foi utilizado para contaminar três reservatórios para a realização do teste.

#### 4.8 Teste de encapsulamento de óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* por gelificação iônica

Esse procedimento foi realizado para verificar se a utilização de óleo essencial encapsulado seria mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano que o óleo misturado diretamente ao fluido de corte. O teste foi realizado com objetivo de simular o funcionamento de um tanque de armazenamento do fluido de corte nas máquinas de usinagem.

Esse teste ocorreu utilizando óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) e os tempos iniciais de coleta das amostras para avaliação do crescimento bacteriano foi determinado com base no teste de tempo de contato. O sistema foi monitorado por 96 horas para verificar se o óleo testado continuava agindo no sistema para impedir o crescimento bacteriano.

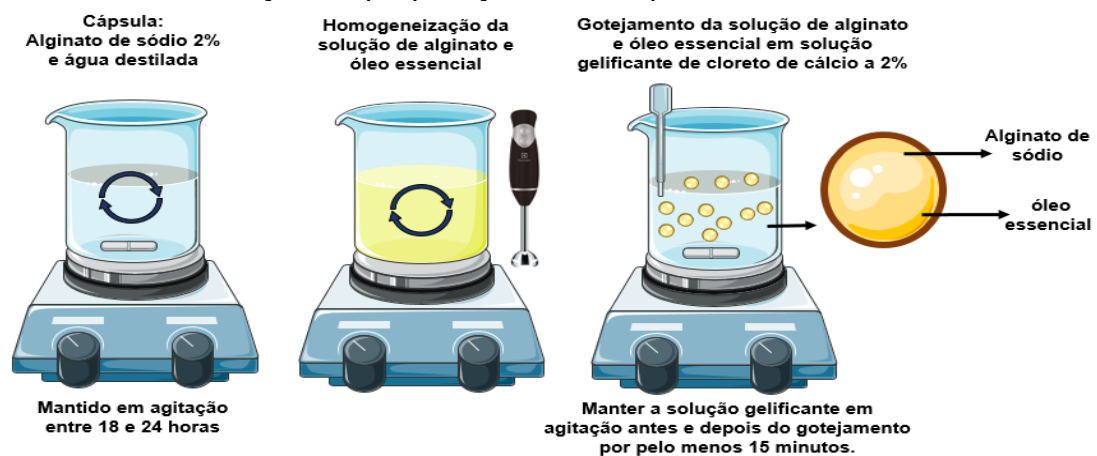
Para a preparação das cápsulas, primeiramente, foram diluídos 2% (4 gramas) de alginato de sódio em 200 mL de água destilada à temperatura de 35°C. Essa mistura foi mantida em agitação a 200 rpm em agitador magnético durante um período de 24 horas. A seguir, a essa mistura, foram adicionados 2,5 mL de óleo essencial puro e foi feita a homogeneização desses produtos com auxílio de um



mixer, formando assim uma emulsão de alginato e óleo essencial. Foi utilizada essa quantidade de óleo essencial para que, no sistema contendo o fluido de corte, a concentração final do óleo essencial fosse de 0,25% em relação à quantidade do fluido de corte presente no reservatório (1000mL).

Posteriormente, foi preparada a solução gelificante na qual ocorreria a formação das cápsulas. Nessa solução, foram diluídos 2% (20 gramas) de cloreto de cálcio em 1000 mL de água destilada e, em seguida, ela foi agitada até que o cloreto de cálcio fosse completamente diluído na água destilada. Depois se realizou o gotejamento da emulsão - preparada anteriormente com alginato e óleos essenciais - na solução gelificante, sendo que, para isso, a solução de cloreto de cálcio ficou em agitação durante e após o processo de gotejamento por pelo menos 15 minutos. As cápsulas que foram introduzidas no sistema mediam cerca de 4 mm de diâmetro (Figura 15).

**Figura 15** - Demonstração da preparação do encapsulamento do óleo essencial.



Fonte: autoria própria

Para avaliar as duas formas de liberação de óleo essenciais em contato com o fluido de corte - a primeira por encapsulamento do óleo e a segunda por dispersão direta do óleo essencial no fluido de corte -, cada recipiente continha 1000 mL de fluido de corte mantido protegido da luz e na temperatura ambiente para fazer a simulação do reservatório das máquinas de usinagem.

O teste de simulação de reservatório do fluido foi composto por três conjuntos: i) contendo óleo essencial/encapsulado adicionado ao fluido de corte usinado; ii) óleo essencial misturado diretamente ao fluido de corte usinado; iii) um

recipiente contendo apenas fluido de corte contaminado sem adição do óleo essencial (Figura 16).

**Figura 16** - Representação esquemática do teste de eficiência de aplicação do óleo essencial



Fonte: autoria própria

Para a contagem das colônias de bactérias presentes em cada sistema foi feito o processo de inoculação de 100  $\mu\text{L}$  de amostra bruta nas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , em placas de Petri, contendo meio de cultura BHI Agar. As inoculações das coletas de alíquotas de fluido de corte foram feitas em triplicata. O monitoramento do sistema foi realizado nos tempos de 0, 5, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 96 horas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa serão apresentados na sequência em que são descritas as metodologias de avaliação da eficiência dos óleos na seção n.º4 - Material e métodos. Em primeiro lugar, os resultados de quantificação, isolamento e caracterização morfológica das colônias bacterianas; em seguida, os resultados de antibiograma e teste de disco-difusão, teste de tempo de contato das bactérias sensíveis aos óleos essenciais e, por fim, o teste de encapsulamento do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela) por gelificação iônica.

### 5.1 Quantificação, Isolamento e caracterização morfológica das colônias bacterianas

O resultado da quantificação de UFC das bactérias heterotróficas utilizando o meio de cultura Agar BHI foi de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL e  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL na primeira e na segunda coleta, respectivamente. A presença de uma elevada quantidade de bactérias era esperada, pois o fluido encontrava-se na máquina-ferramenta há aproximadamente 5 meses.

Trafny et al. (2015) relataram que a contaminação microbiana nos fluidos de corte analisados, no trabalho desenvolvido por eles, chegou a uma contagem superior a  $10^6$  UFC/mL em pelo menos 30% das máquinas nas quais a coleta ocorreu. Nakagawa (2016) descreveu que, no fluido de corte mineral, a quantidade de UFC/mL foi de aproximadamente  $1,9 \times 10^6$  e no vegetal foi de  $1,2 \times 10^5$  antes do processo de limpeza das máquinas.

Veillette (2004) realizou a contagem de UFC em amostras de fluido de corte, em diferentes tempos de usinagem, na máquina. Na primeira amostragem, antes da higienização e troca do fluido de corte, foi encontrado cerca de  $4,5 \times 10^5$  células viáveis. Após uma nova recarga de fluido estéril, a concentração passou a ser de  $1,6 \times 10^3$  UFC/mL, em apenas 12 h, e após 6 meses de uso do fluido de corte na máquina-ferramenta a concentração microbiana foi de  $3,1 \times 10^5$  células viáveis.

Suliman et al. (1997) relatam que as quantificações das unidades formadoras de colônias bacterianas não ultrapassaram a marca de  $10^5$  UFC/mL. Gilbert et al. (2010) encontraram uma concentração de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas cultiváveis em um valor médio de  $3,04 \times 10^7$  UFC/mL, valor próximo ao encontrado neste estudo.

A quantificação de bactérias potencialmente patogênicas foi realizada no meio de cultura CHROMAgar, sendo contabilizado, na primeira coleta,  $5,8 \times 10^4$  UFC/mL e  $2,4 \times 10^6$  UFC/mL na segunda coleta. Houve a identificação de 6 gêneros de bactérias potencialmente patogênicas presentes no fluido de corte.

Na tabela 1, são apresentados os valores obtidos e as porcentagens de cada bactéria identificada após visualização no meio de cultura CHROMagar *Orientation* e após caracterização morfotintorial dos isolados.

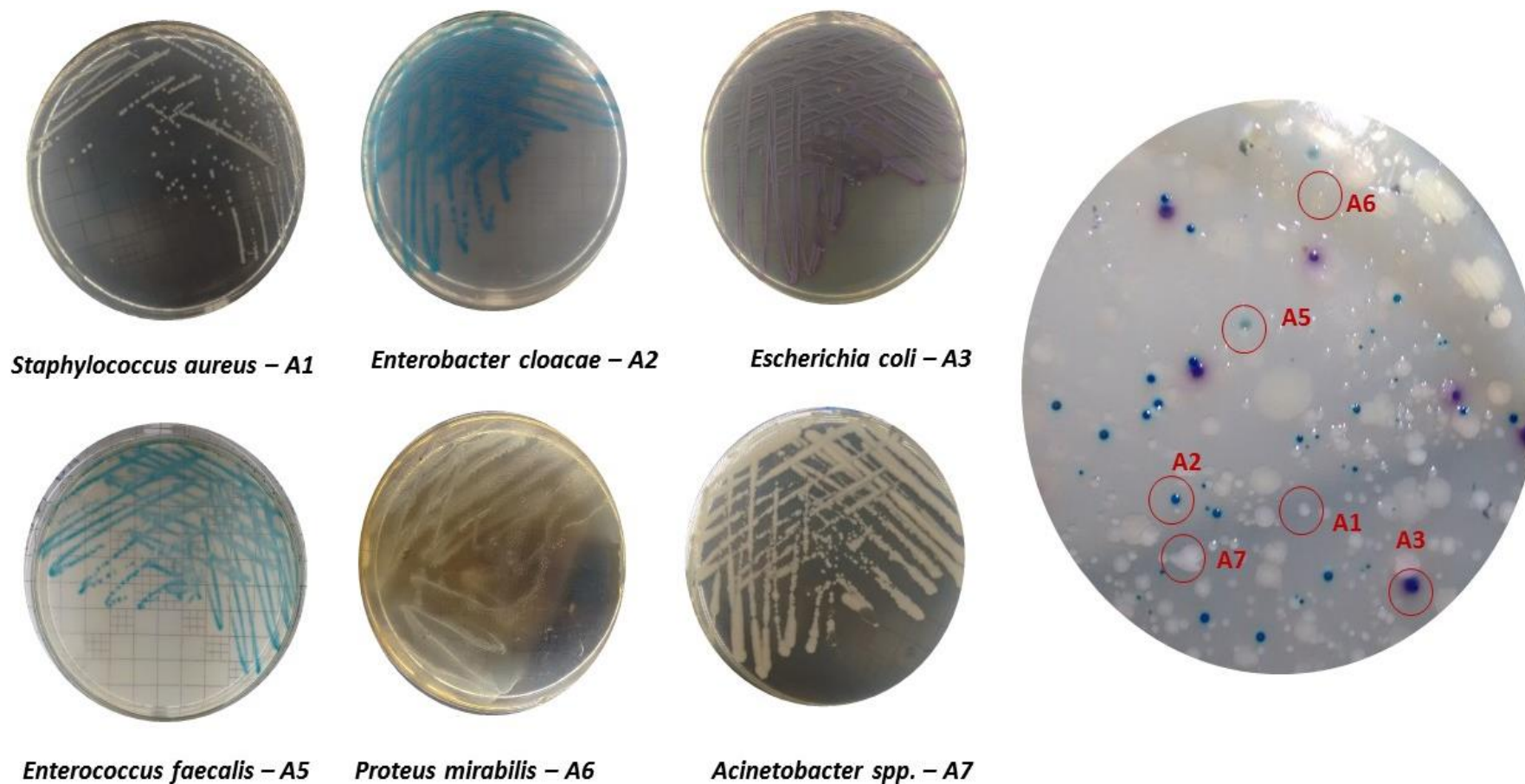
Na Figura 17, são apresentados os resultados do isolamento das bactérias potencialmente patogênicas, utilizando o meio de cultura seletivo CHROMagar *Orientation*. Na Figura 18, pode-se observar as fotos das microscopias óticas realizadas para cada grupo de bactérias, após o isolamento e coloração de Gram.

**Tabela 1:** Contagem de colônias bacterianas presentes no fluido de corte, porcentagem e desvio padrão.

Bactéria	UFC/mL	Porcentagem	UFC/mL	Porcentagem
	1° Coleta	(%)	2° Coleta	(%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (A1)	$7,8 \times 10^5 \pm 67,6$	22,35	$2,3 \times 10^6 \pm 7$	15,75
<i>Enterobacter cloacae</i> (A2)	$8,2 \times 10^5 \pm 6,6$	23,50	$2,1 \times 10^6 \pm 9,5$	14,38
<i>Escherichia coli</i> (A3)	$2,5 \times 10^5 \pm 4,4$	7,16	$5,7 \times 10^6 \pm 28,4$	39,72
<i>Enterococcus faecalis</i> (A5)	$3,9 \times 10^5 \pm 29,3$	11,18	$1,6 \times 10^6 \pm 9,5$	10,95
<i>Proteus mirabilis</i> (A6)	$7,3 \times 10^5 \pm 99,6$	20,92	$1 \times 10^6 \pm 7,5$	6,84
<i>Acinetobacter</i> spp. (A7)	$5,3 \times 10^5 \pm 42,2$	15,11	$1,8 \times 10^6 \pm 2$	12,32
<b>Total</b>	<b><math>3,5 \times 10^6</math></b>	<b>100</b>	<b><math>1,45 \times 10^7</math></b>	<b>100</b>

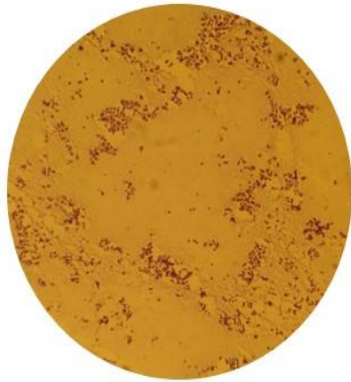
Fonte: autoria própria

**Figura 17-** Resultado do isolamento das bactérias potencialmente patogênicas utilizando o meio de cultura seletivo CHROMagar Orientation.

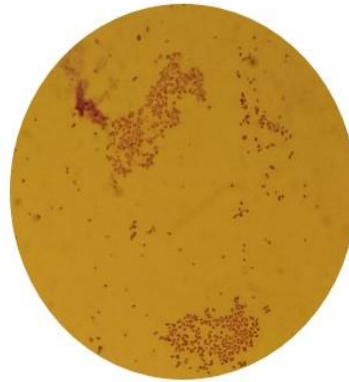


Fonte: imagem de autoria própria. Informações de cor e aspecto obtidas da Ficha Técnica do Produto BD Difco Chromagar Orientation Medium (2011).

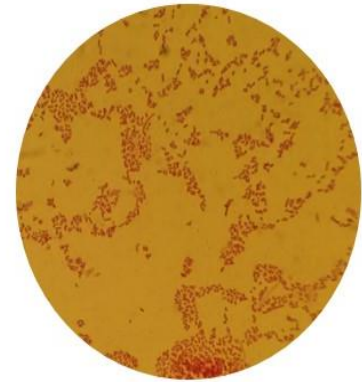
**Figura 18** - Resultado da microscopia óptica após aplicação da técnica de coloração de Gram para cada grupo de bactérias potencialmente patogênicas isoladas (aumento de 1.000 vezes)



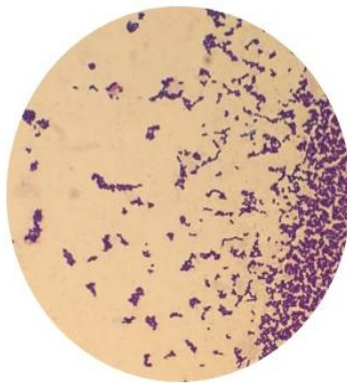
*Staphylococcus aureus* (A1)



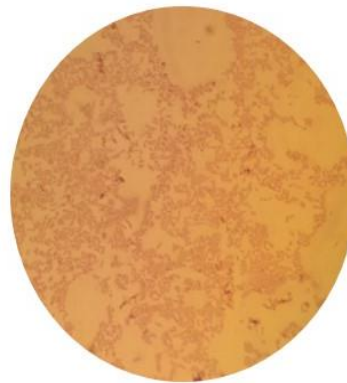
*Enterobacter cloacae* (A2)



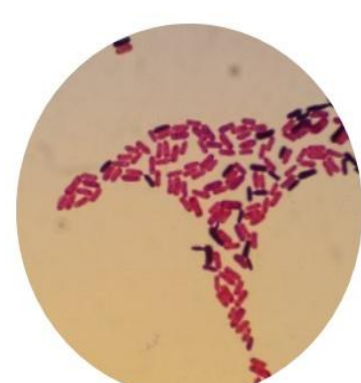
*Escherichia coli* (A3)



*Enterococcus faecalis* (A5)



*Proteus mirabilis* (A6)



*Acinetobacter* spp.. (A7)

Fonte: autoria própria

Dos seis gêneros de bactérias isolados a partir do fluido de corte, dois foram classificados como Gram-positivas e quatro como Gram-negativas. No quadro 3, é possível ver a descrição completa da caracterização morfotintorial das bactérias isoladas a partir do fluido de corte coletado na fábrica.

**Quadro 3** – Características de coloração no CHROMagar e morfotintorial das bactérias presentes no fluido de corte.

Bactéria	Coloração CHROMagar	Gram	Forma/arranjo
<i>Staphylococcus aureus</i> (A1)	Branco brilhante	Positivo (+)	Cocos/ Estafilococos
<i>Enterobacter cloacae</i> (A2)	Azul escuro	Negativo (-)	Cocos/ Estreptococos
<i>Escherichia coli</i> (A3)	Roxo	Negativo (-)	Bacilos
<i>Enterococcus faecalis</i> (A5)	Azul esverdeado	Positivo (+)	Cocobacilos
<i>Proteus mirabilis</i> (A6)	Tonalidade pálida a bege, envoltas num halo de cor âmbar;	Negativo (-)	Bacilos/ Estreptobacilos
<i>Acinetobacter</i> spp. (A7)	Branco fosco	Negativo (-)	Bacilos

Fonte: autoria própria

Analisando os dados apresentados na Tabela 1, nota-se que houve variação nas porcentagens de bactérias que cresceram nas placas de Petri de coletas realizadas. Este resultado mostra que as condições ambientais (temperatura, umidade), pessoas que manipulam a máquina, tipo de material, entre outras, podem interferir nas populações bacterianas existentes no fluido de corte.

Van Der Gast et al. (2003) demonstraram que, nas dez amostras coletadas, foi possível fazer o isolamento de 179 bactérias, sendo um total de 11 gêneros e 15 espécies. A bactéria Gram-positiva mais abundante foi *Clavibacter michiganensis*, presente em 90% das amostras, e a Gram-negativa foi a bactéria *Methylobacterium mesophilicum*, encontrada em todas as amostras. Dentre as bactérias identificadas está a *Enterococcus faecium*, pertencente ao gênero *Enterococcus*.

Murat et al. (2012) realizaram uma investigação em três plantas industriais localizadas na França, nas quais havia trabalhadores com doenças ocupacionais. A concentração média encontrada pelos autores foi de  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL para emulsões aquosas e  $2,5 \times 10^4$  UFC/mL para fluidos de corte puros. Entre as bactérias isoladas na primeira planta, havia cerca de 12% de bactérias Gram-positivas e, na segunda planta, 7% de bactérias Gram-negativas.

Entre as bactérias isoladas por Gilbert et al. (2010) houve a identificação da bactéria *Acinetobacter* spp tendo um total de  $4,33 \times 10^2$  UFC/mL, um número inferior aos resultados encontrados neste trabalho ( $1,6 \times 10^6$  e  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL, bactérias heterotróficas).

## 5.2 Antibiograma

No quadro 4 são apresentados os resultados de sensibilidade aos antibióticos testados pelas bactérias isoladas.

**Quadro 4** – Grau de sensibilidade das bactérias em relação aos antibióticos.

Antibióticos	Bactérias					
	<i>S. aureus</i> (A1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (A2)	<i>Escherichia coli</i> (A3)	<i>Proteus mirabilis</i> (A6)	<i>Acinetobacter spp.</i> (A7)	<i>Enterococcus faecalis</i> (A5)
CIP 05 µg	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível
SUT 25 µg	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível
GEN 10 µg	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível
AMO 10 µg	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente
VAN 30 µg	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
CLO 30 µg	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
CFL30 µg	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente
DOX 30 µg	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível
AMC30 µg	Resistente	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Resistente	Resistente

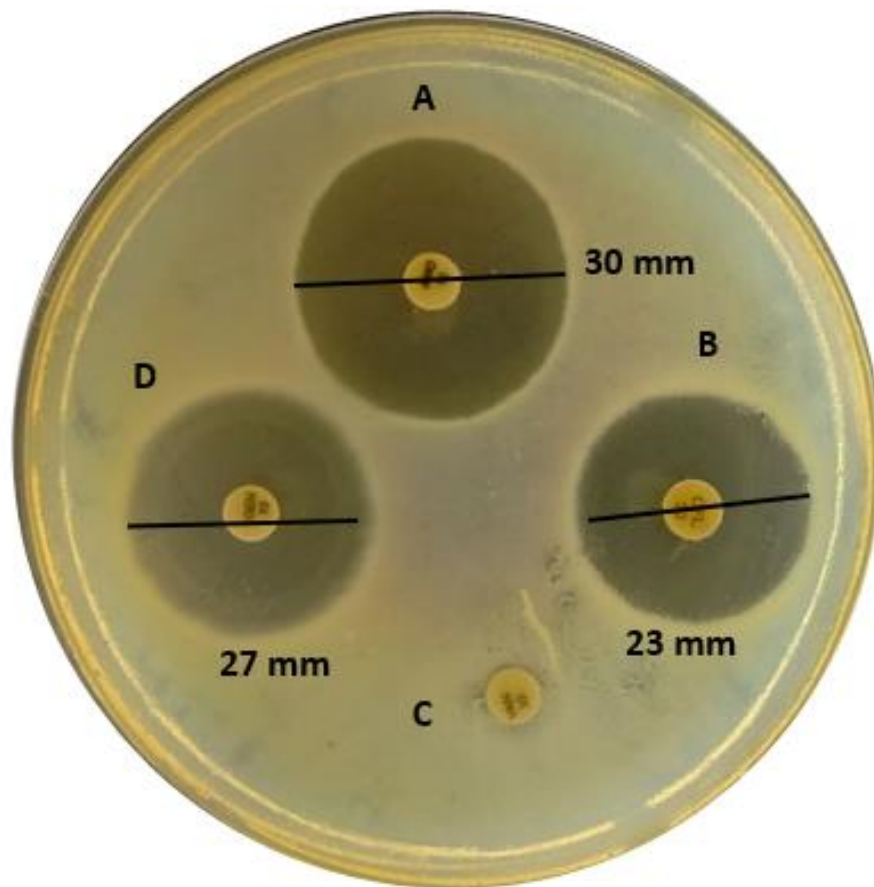
Fonte: CLSI (2005)

Entre as bactérias testadas, a que apresentou a maior resistência ao maior número de antibióticos testados foi a bactérias *Acinetobacter spp* (A7). Dos nove antibióticos testados, a bactéria apresentou resistência a sete; a seguir, a bactéria *Staphylococcus aureus* (A1) apresentou resistência a seis antibióticos; *Enterococcus faecalis* (A5) a quatro antibióticos; *Escherichia coli* (A3) e *Proteus mirabilis* (A6), resistência a dois antibióticos. As bactérias *Enterobacter cloacae* (A2), *Escherichia coli* (A3) e *Proteus mirabilis* (A6) apresentaram o grau de inibição classificado com intermediário em um antibiótico.

A bactéria que apresentou a maior sensibilidade aos antibióticos foi a bactéria *Enterobacter cloacae* (A2): oito dos nove antibióticos testados; *Escherichia coli* (A3) e *Proteus mirabilis* (A6), sensibilidade a seis e sete antibióticos, respectivamente; bactéria *Enterococcus faecalis* (A5), sensibilidade a cinco antibióticos; *Staphylococcus aureus* (A1), a três antibióticos; *Acinetobacter spp.* (A7) sensibilidade a dois antibióticos. Na Figura 19, é possível observar a formação dos halos e a medida conforme cada antibiótico para a bactéria *Proteus mirabilis*.



**Figura 19** - Exemplo de placa de Petri apresentando os halos formados nos testes de antibiograma realizados com *Proteus mirabilis* (A6).



Fonte: autoria própria.

Legenda – Antibióticos testados: A- Amoxicilina (amo 10); B-cefalotina (cfl 30); C-vancomicina (van 30); D-gentamicina (gen 10).

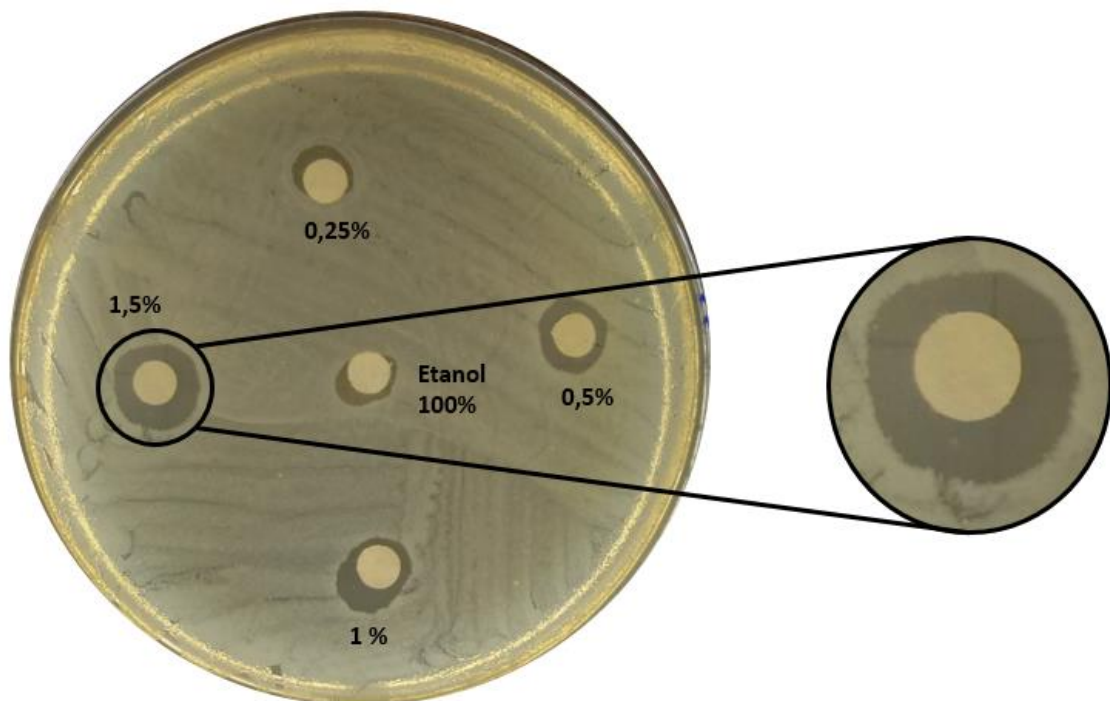
Silveira et al. (2012) testou os antibióticos ampicilina e cloranfenicol frente os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *P. vulgaris*. Os discos contendo esses antibióticos tinham o tamanho de 9 mm, os halos formados por esses antibióticos ficaram entre 18,9 mm e 36,4 mm. Os halos formados pelo antibiótico ampicilina são representativos para o antibiótico Amoxicilina, segundo descrição do documento CLSI (2005).

Diferente desse resultado, neste trabalho não houve formação dos halos quando exposto ao antibiótico Amoxicilina - com exceção da bactéria *Proteus mirabilis* (A6) que obteve formação de halo medindo 30 mm, sendo maior que o halo registrado por Silveira et al. (2012). Em relação ao antibiótico cloranfenicol, não houve formação de halo apenas pela bactéria *S. aureus*. O que mostra que as bactérias se mostram resistentes em relação ao antibiótico.

### 5.3 Teste de disco-difusão

Na Figura 20, é possível observar a formação dos halos formados pelos discos impregnados com as concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela).

**Figura 20** - Demonstração de halo formado no teste de disco-difusão utilizando o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) com a bactéria *Enterococcus faecalis* - A5



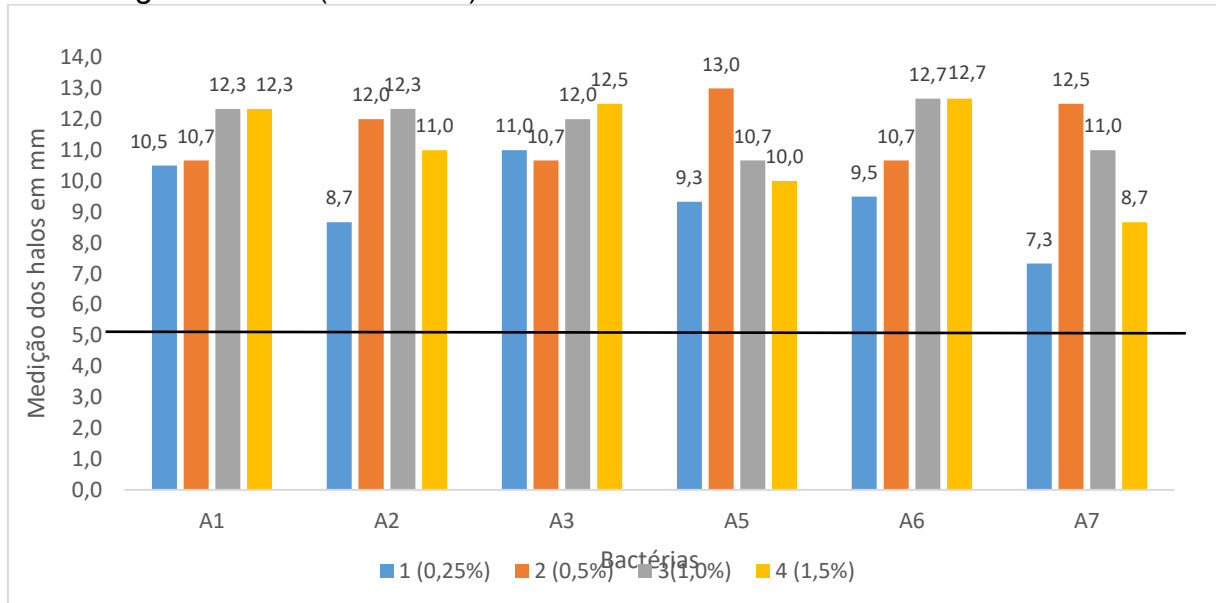
Fonte: autoria própria

As seguir, nas Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, respectivamente, serão apresentados os tamanhos dos halos formados pelas diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Syzygium aromaticum* (cravo) e óleo vegetal de *Carapa guianensis* (andiroba). A linha horizontal dos gráficos indica o tamanho do disco de papel de filtro utilizado para a impregnação dos óleos.

Houve formação de halo em todas as concentrações utilizadas do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão). Na concentração de 0,25%, os halos mediram entre 7,3 mm e 10,5 mm. Na concentração de 0,5%, o maior halo formado

foi de 13,0 mm, sendo o maior valor de halo formado entre as concentrações estudadas. Na concentração de 1%, os halos formados ficaram na faixa de 10,7 mm e 12,7 mm (Figura 21).

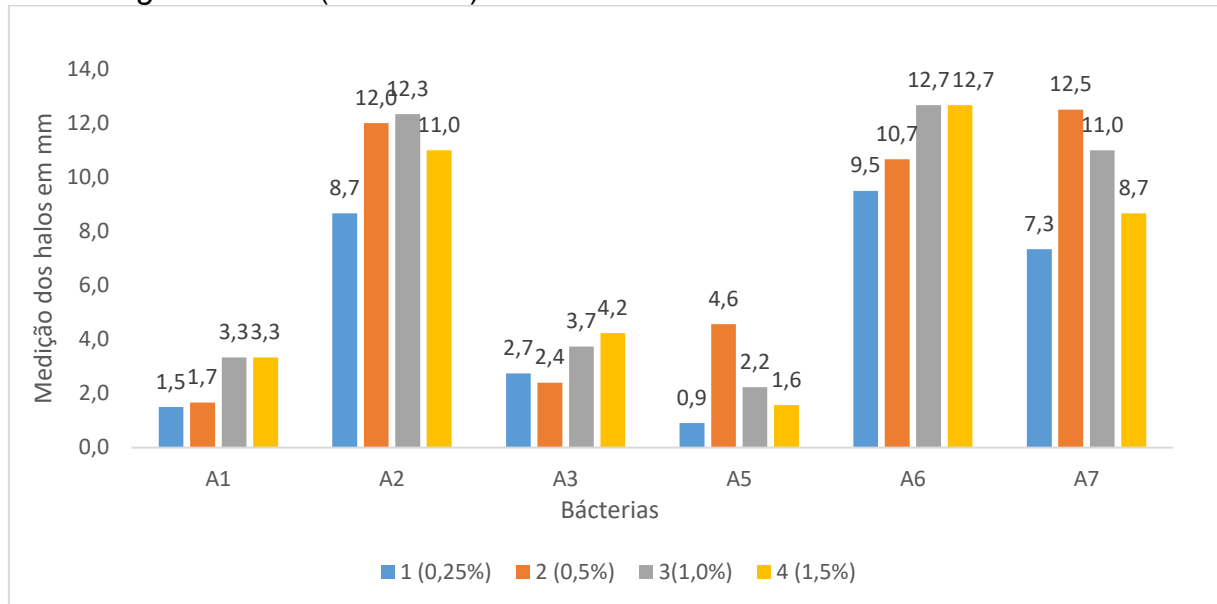
**Figura 21-** Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Alfavacão).



Fonte: autoria própria. A linha horizontal representa o tamanho do disco de filtro utilizado no teste. Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 – *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

Na figura 22, é apresentado o tamanho dos halos formados pelo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Alfavacão), descontando o tamanho do halo formado pelo solvente etanol, utilizado para fazer a diluição do óleo.

**Figura 22** - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Alfavacão) descontando o efeito do solvente etanol.



Fonte: autoria própria.

Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 – *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

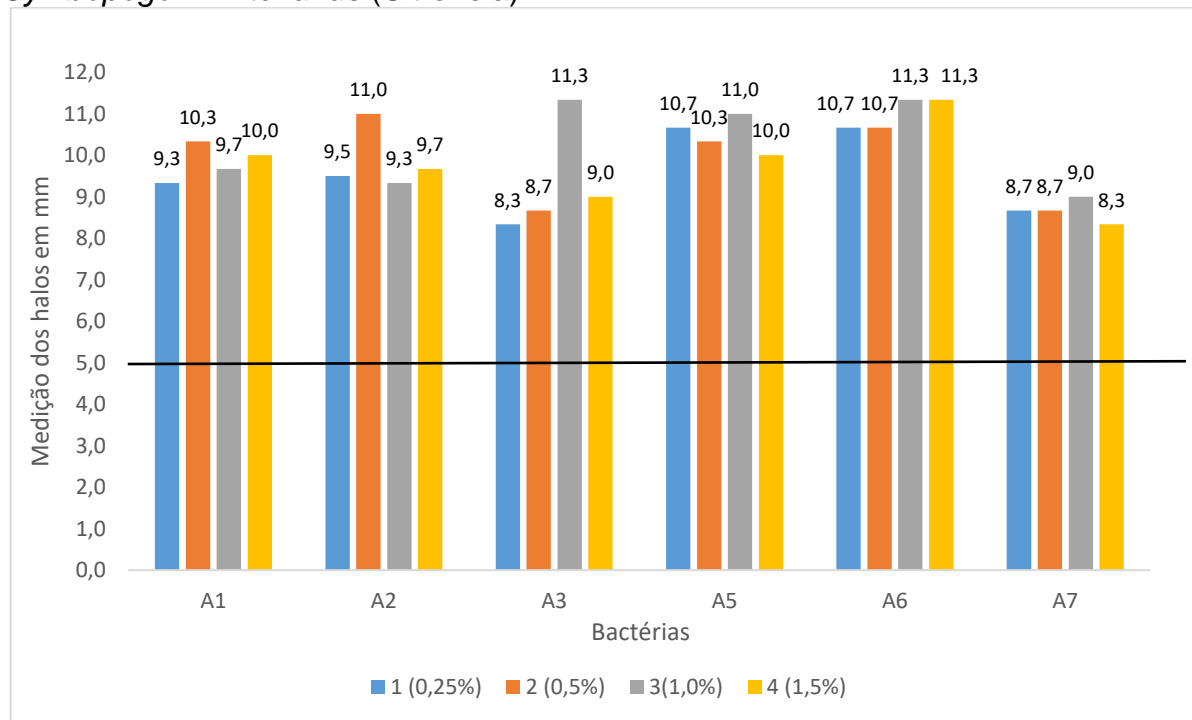
Houve formação de halo pelo solvente etanol em três das seis bactérias utilizadas no teste. Levando isso em consideração, na menor concentração utilizada para a realização do teste, verificou-se que a bactéria com maior resistência ao óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão) foi a bactéria *Enterococcus faecalis* (A5), com um halo de 0,9 mm. A que apresentou maior sensibilidade foi a bactéria *Escherichia coli* (A3), apresentando um halo de 2,7 mm.

Porém, se analisarmos as bactérias nas quais não houve a interferência do etanol, a bactéria que apresentou maior resistência foi a *Acinetobacter* (A7), com halo de 7,3 mm, e a que apresentou maior sensibilidade foi a *Proteus mirabilis* (A6), com halo de 9,5 mm.

Para o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela), as formações dos halos foram observadas em todas as bactérias, nas concentrações testadas. Os halos variaram entre 8,3 mm e 11,3 mm (Figura 23).

Analisando os halos formados a partir da menor concentração, a bactéria que apresentou maior resistência a esse óleo essencial foi a *Escherichia coli* (A3) com um halo de 8,3 mm e as bactérias com maior sensibilidade foram as *Enterococcus faecalis* (A5) e *Proteus mirabilis* (A6) com halos de 10,7 mm de diâmetro.

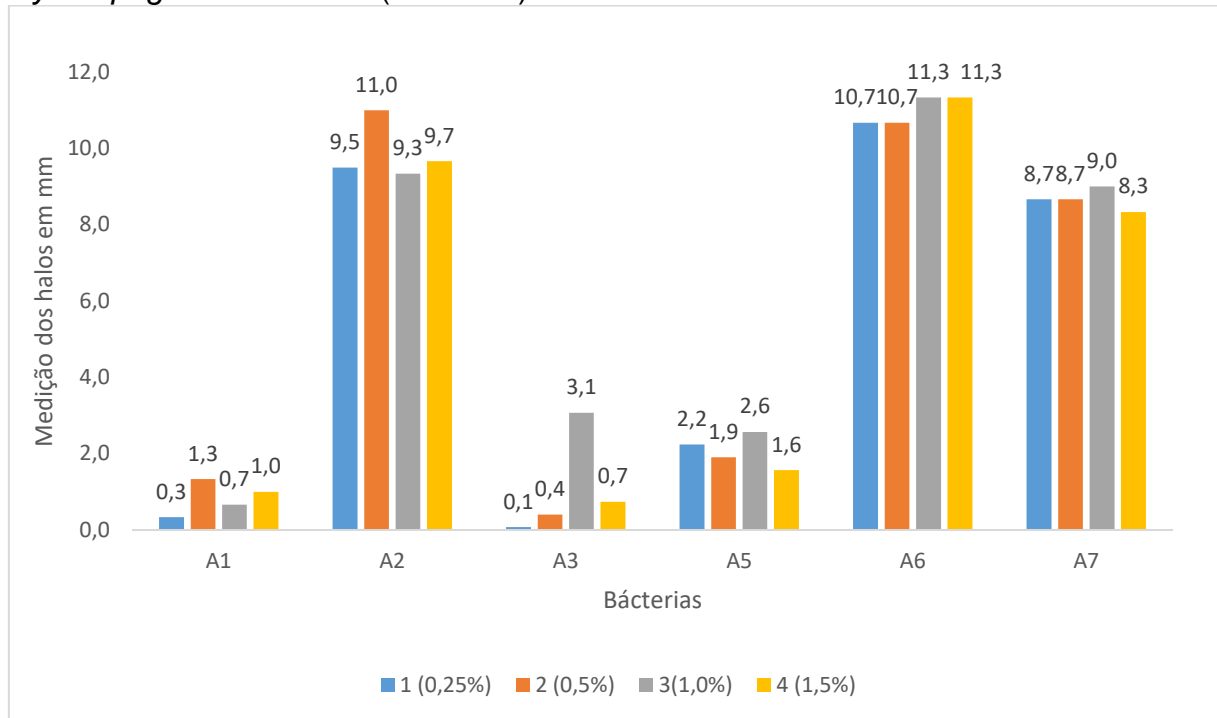
**Figura 23-** Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela).



Fonte: autoria própria. A linha horizontal representa o tamanho do disco de filtro utilizado no teste. Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 – *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

Analisando aquelas em que houve interferência do solvente, os resultados são os seguintes: nas bactérias *Escherichia coli* (A3) e *Staphylococcus aureus* (A1), na menor concentração de óleo essencial, o tamanho do halo formado foi pequeno, representando maior resistência dessas bactérias ao óleo essencial. Nas bactérias em que não houve interferência do solvente, o menor halo formado foi pela *Acinetobacter* (A7), representando maior resistência ao óleo. O maior halo formado, nesse caso, foi pela bactéria *Proteus mirabilis* (A6), o que representa uma maior sensibilidade (Figura 24).

**Figura 24** - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela) descontando o efeito do solvente etanol.



Fonte: autoria própria.

Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 - *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

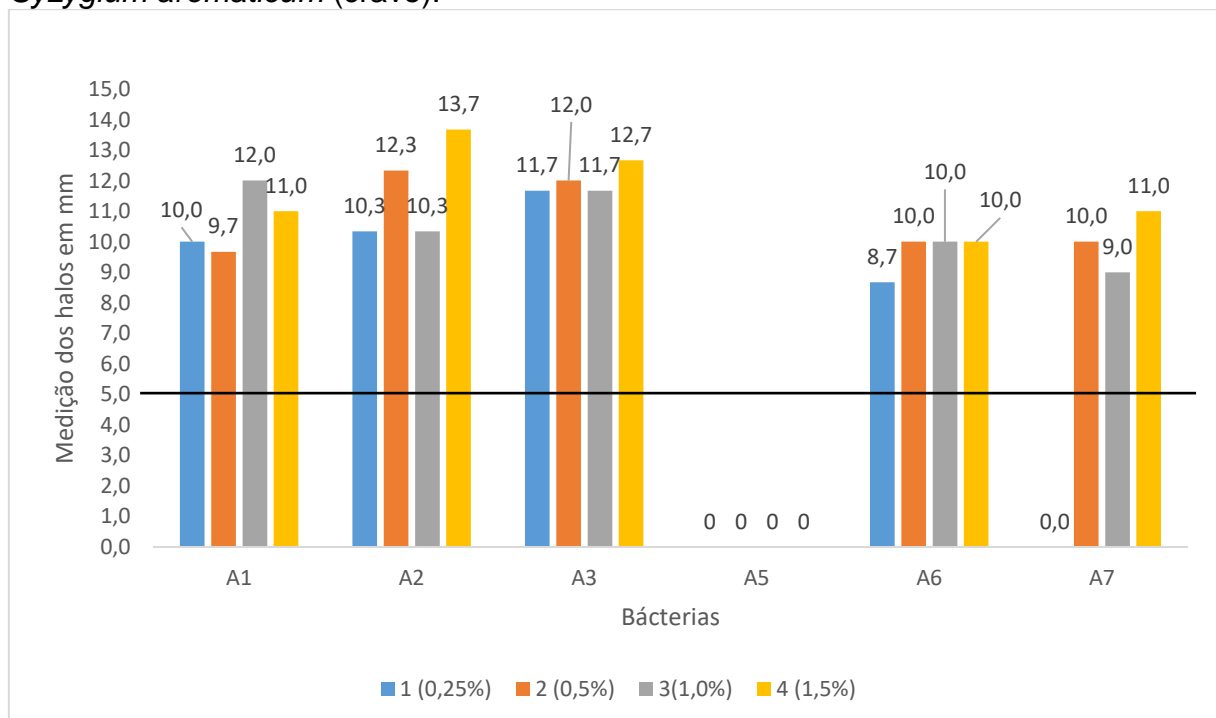
Andrade (2010) utilizou a metodologia de difusão cavidade em ágar para medir a concentração mínima inibitória dos óleos essenciais por ele testado. O autor verificou que não ocorreu processo de inibição em relação à bactéria *Escherichia coli*, o que representa uma resistência dessa bactéria em relação ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) por ele testado.

Assim como Andrade (2010), citado anteriormente, Silveira et al. (2012) não registraram a formação de halos pelo óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) em relação à bactéria *Escherichia coli*. Os autores utilizaram a metodologia de disco-difusão, com discos medindo 9mm, para as bactérias *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *P. vulgaris*, obtendo halos de 33,7 mm, 17,7 mm e 18,5 mm, respectivamente. Os halos obtidos por esses autores são superiores aos descritos neste trabalho, porém o tamanho do disco utilizado é diferente, sendo que o tamanho utilizado nesse trabalho foi de 5 mm. Os autores afirmam que, entre os óleos testados, o que apresentou maior halo de inibição para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* foi o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela).

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo) não teve ação inibitória em todas as bactérias testadas, sendo as bactérias *Enterococcus faecalis* (A5) e *Proteus mirabilis* (A6) as mais resistentes ao óleo testado. O menor halo formado, na menor concentração, com interferência do solvente, foi o da bactéria *Enterobacter cloacae* (A2), com halo de 0,7 mm (Figura25).

Silvestri et al. (2010) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* para diversas bactérias, entre elas estão algumas das bactérias que foram alvo deste trabalho, como a *E. faecalis*, *S. aureus*, *Acinetobacter spp.*, *E. cloacae* e *E. coli*. Os autores utilizaram a técnica de disco-difusão, impregnando com 5, 10 e 15 µL de óleo essencial de cravo-da-índia essas bactérias, os discos mediam 7 mm. Para a menor quantidade (5µL), os autores obtiveram as seguintes médias de halo: *S. aureus*: 31,50 mm; *Acinetobacter spp.*: 13,50 mm; *E. cloacae*: 17 mm; *E. coli* : 19 mm. Para a *Enterococcus. Faecalis*, não teve formação de halo em nenhuma das concentrações utilizadas pelos autores. O mesmo ocorreu no desenvolvimento deste trabalho.

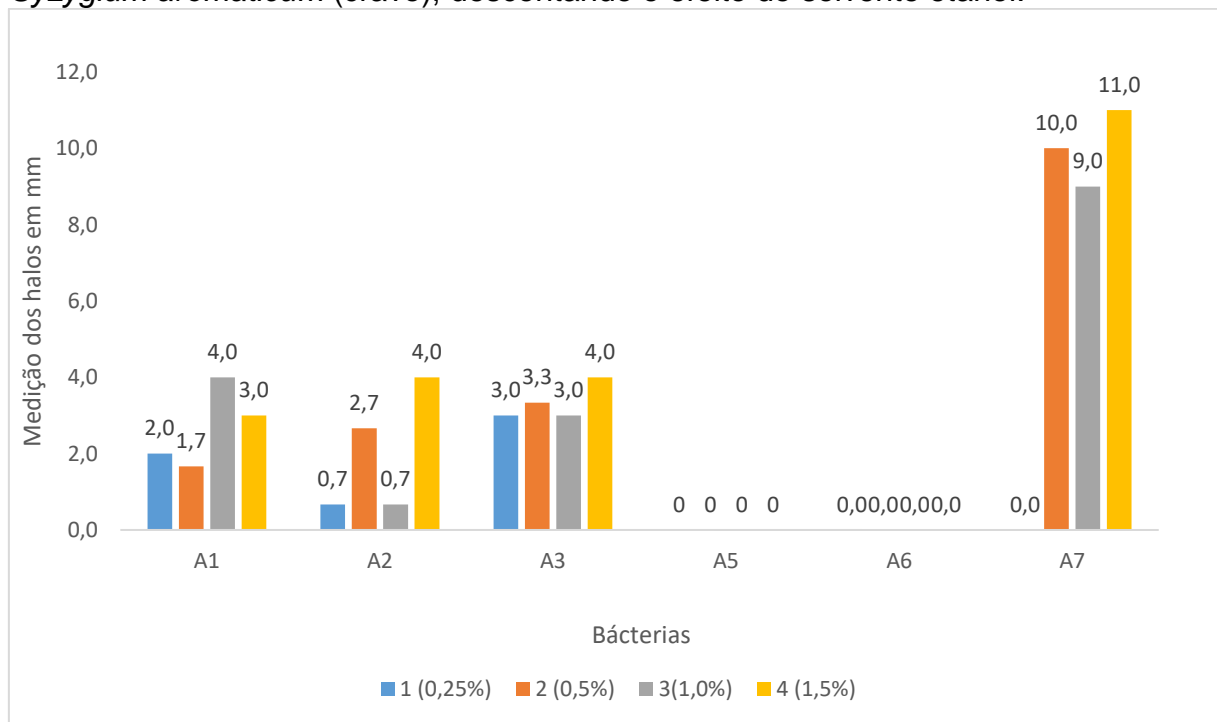
**Figura 25** - Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo).



Fonte: autoria própria. A linha horizontal representa o tamanho do disco de filtro utilizado no teste. Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 – *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter spp.*

A bactéria que se mostrou mais sensível, se consideramos que não houve crescimento de halo pelo solvente, foi a *Acinetobacter* (A7), com halo medindo 11,0 mm, porém ela não formou halo na concentração de 0,25%, que foi a menor concentração testada (Figura 26).

**Figura 26** – Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo), descontando o efeito do solvente etanol.



Fonte: autoria própria.

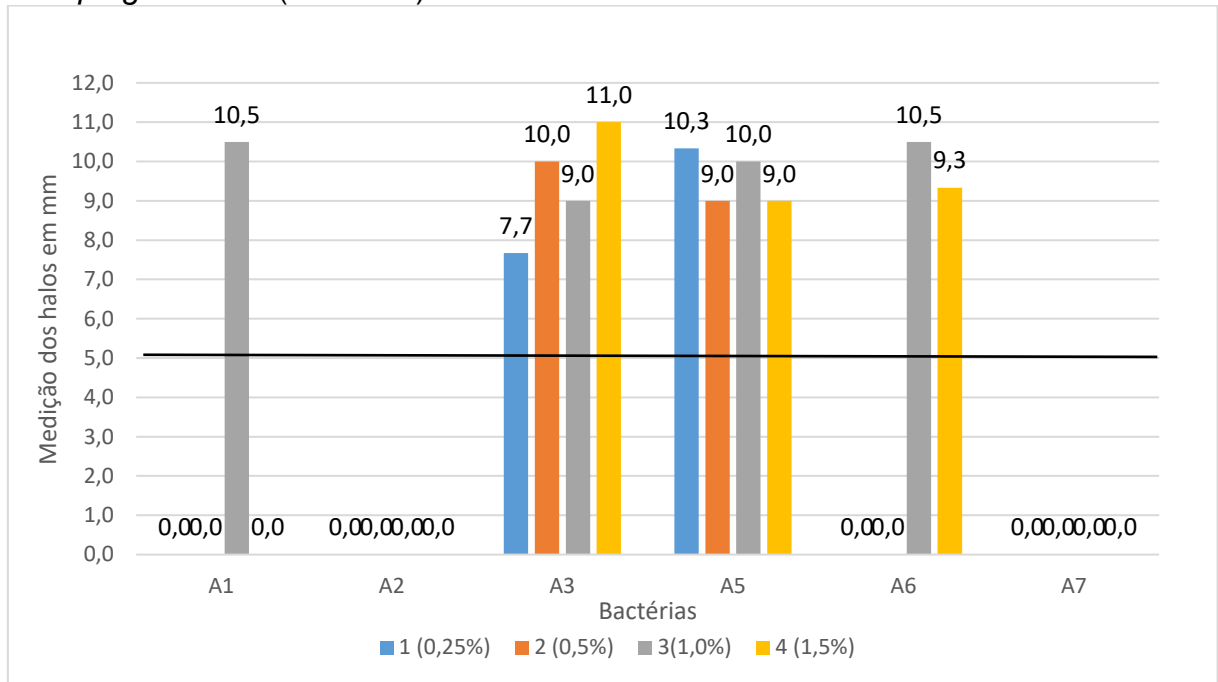
Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 - *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter spp.*

O óleo vegetal de *Carapa guianensis* (andiroba) teve eficiência em quatro bactérias testadas. Porém, no que se refere à *Staphylococcus aureus* (A1), houve formação de halo apenas na concentração de 1,0%. Com a bactéria *Proteus mirabilis* (A6), houve formação de halo nas concentrações de 1,0% e 1,5 %, sem interferência do solvente (Figura 27).

O menor halo formado, na menor concentração testada, foi de 1,9 mm. Não houve formação de halo em nenhuma das concentrações testadas para as bactérias *Enterobacter cloacae* (A2) e *Acinetobacter spp.* (A7), o que pode representar uma maior resistência dessas bactérias em relação ao óleo testado (Figura 28).

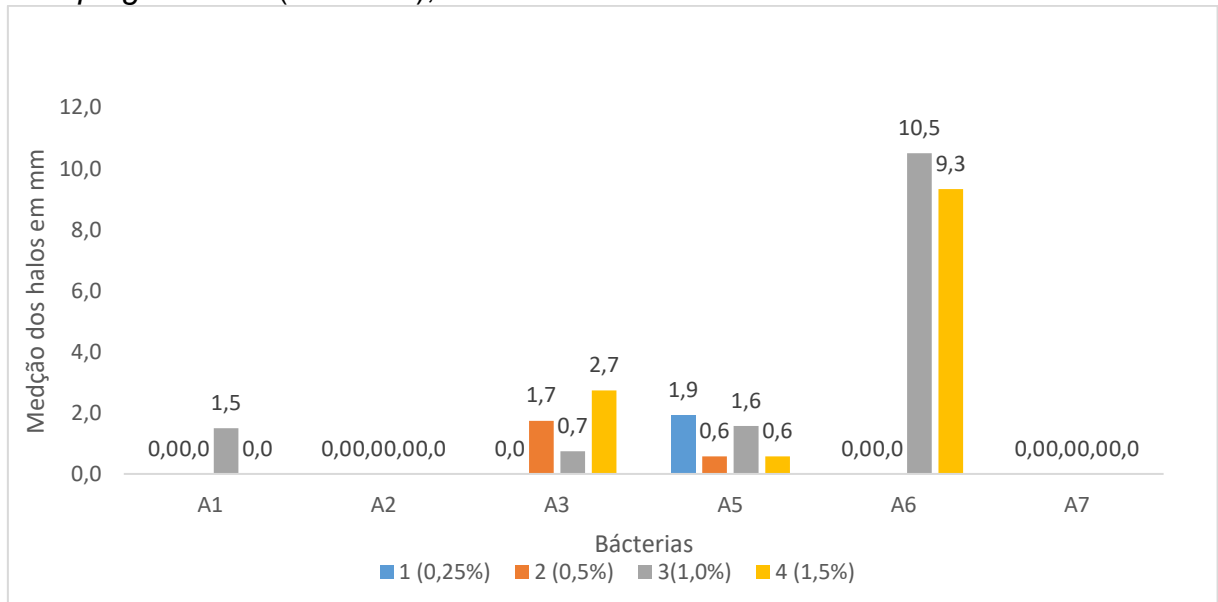


**Figura 27-** Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Carapa guianeses* (Andiroba)



Fonte: autoria própria. A linha horizontal representa o tamanho do disco de filtro utilizado no teste. Legenda: A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 - *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

**Figura 28 -** Medição dos halos em diferentes concentrações do óleo essencial de *Carapa guianeses* (Andiroba), descontando o efeito do solvente etanol.



Fonte: autoria própria. A1 – *Staphylococcus aureus*; A2 – *Enterobacter cloacae*; A3 – *Escherichia coli*; A5 - *Enterococcus faecalis*; A6 – *Proteus mirabilis*; A7 – *Acinetobacter* spp.

Silveira et al. (2012) fizeram uma comparação entre a sensibilidade aos antibióticos Ampicilina 10 µg e Cloranfenicol 30µg e o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela), utilizando a técnica de disco-difusão, com disco de papel de 9 mm.

No trabalho desses autores, (i) para a bactéria *Escherichia coli* não houve formação de halo pelo óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela); (ii) o maior halo formado foi para a *Staphylococcus aureus*, de 37,7 mm; (iii) não houve diferença entre o antibiótico ampicilina e o halo formado pela bactéria *Enterococcus faecalis*, de 17,7. Esses valores indicam sensibilidade aos antibióticos testados e também indicam sensibilidade ao óleo de citronela.

Comparando-se os tamanhos dos halos formados pelas bactérias no teste de sensibilidade aos antibióticos e nos testes de disco-difusão realizados, obteve-se resultados diferentes de Silveira et al. (2012). Neste trabalho, (i) houve formação do halo pelo óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) (Tabela 2) nos diferentes microrganismos testados; (ii) as bactérias mostraram-se resistentes ao antibiótico Amoxicilina, pois não houve formação de halo e (iii) mostraram-se menos resistentes ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela), pois houve inibição do crescimento com formação de halo.

**Tabela 2** – Comparação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* com os antibióticos Amoxicilina e Cloranfenicol (Média mm e desvio padrão).

Bactérias	Citronela	Amoxicilina	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> (A1)	9,3 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 0
<i>Enterococcus faecalis</i> (A5)	10,7 ± 1,5	0 ± 0	28 ± 2,5
<b><i>Escherichia coli</i> (A3)</b>	<b>8,3 ± 2,3</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>26 ± 1,2</b>

Fonte: autoria própria

Silveira et al. (2012) relataram ainda da dificuldade em se comparar os resultados dos trabalhos obtidos por diferentes autores, pois a metodologia utilizada difere em relação à preparação dos inóculos e à forma com que os óleos essenciais são testados, sejam eles puros ou diluídos. Caso sejam diluídos, é preciso saber

quais solventes são utilizados nesse processo de diluição e quais as concentrações utilizadas; caso a metodologia seja de disco-difusão, quais são os tamanhos utilizados e qual a gramatura do papel, entre outros fatores que podem interferir no resultado de cada autor.

Segundo Rahman e Kang (2009), os microrganismos patogênicos não correm risco de desenvolver resistência aos óleos essenciais, devido à composição química de cada óleo, que atuam de diferentes formas sobre os microrganismos. Devido a essas características, a utilização de óleos essenciais se torna vantajosa em relação a outros antimicrobianos.

#### 5.4 Teste de tempo de contato das bactérias sensíveis aos óleos essenciais

Para a realização do teste de tempo de contato, foi utilizada a concentração de 0,25% para os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon winterianus* (citronela) e *Syzygium aromaticum* (cravo), pois foi a menor concentração testada que teve ação inibitória nas bactérias isoladas do fluido de corte.

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), a partir do tempo de 30 segundos, teve o processo de inibição das bactérias testadas, com exceção da bactéria *Acinetobacter* (A7), em que o processo de inibição total ocorreu em 1 minuto (Quadro 5). Na Figura 29, é apresentado o resultado do crescimento das bactérias em contato com o agente inibidor nas placas de Petri.

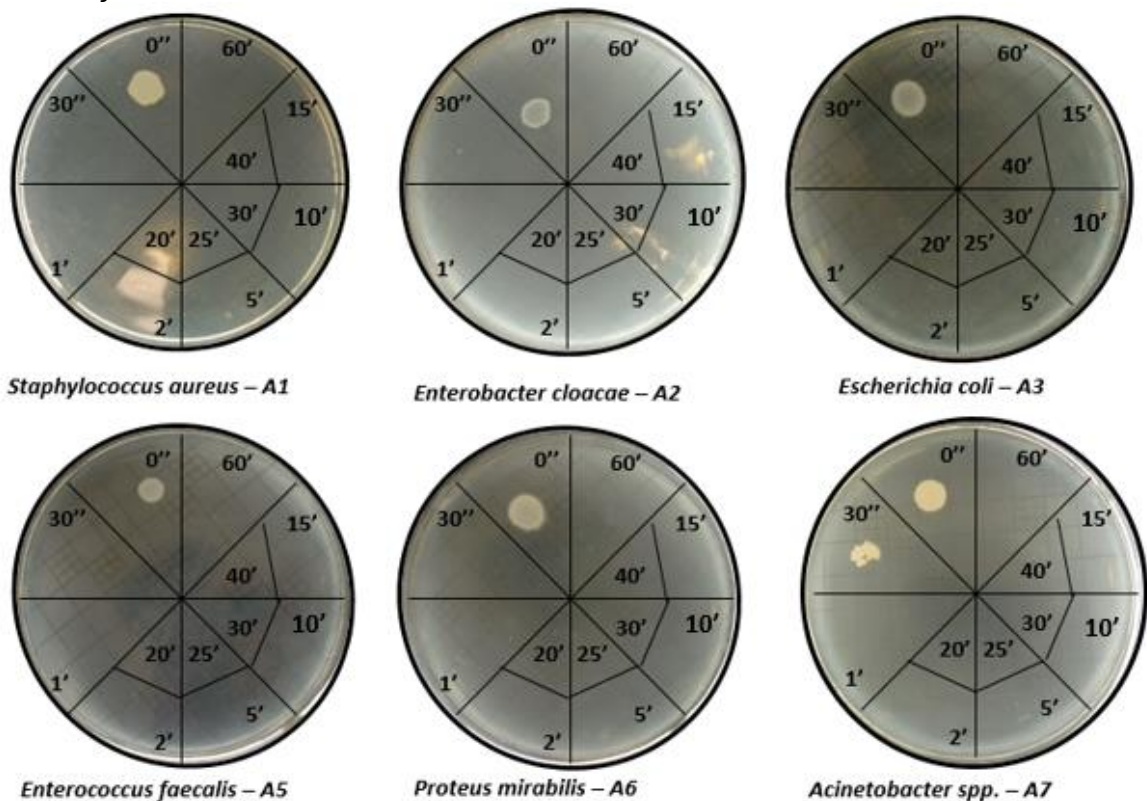
**Quadro 5** – Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão).

Bactéria	Óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (alfavacão)											
	Tempo de Contato											
	0	30''	1'	2'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	60'
A1 <i>Staphylococcus aureus</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A2 <i>Enterobacter cloacae</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A3 <i>Escherichia coli</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A5 <i>Enterococcus faecalis</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A6 <i>Proteus mirabilis</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A7 <i>Acinetobacter</i>	xxx	xx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Fonte: autoria própria.

Legenda: xxx – grande crescimento; xx – médio crescimento; x- pouco crescimento; o – sem crescimento.

**Figura 29** - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão) na concentração de 0,25%



Fonte: autoria própria

As bactérias tiveram inibição em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) na concentração de 0,25%. A

bactéria que apresentou maior resistência foi a *Acinetobacter spp* (A7), sendo que não houve processo de inibição dessas bactérias.

A bactéria *Enterococcus faecalis* (A5) apresentou redução a partir de 1 minuto e com 2 minutos foi observado a inibição total na placa de Petri. As bactérias *Enterobacter cloacae* (A2) e *Proteus mirabilis* (A6) tiveram inibição total a partir de 10 minutos e a *Escherichia coli* (A3) iniciou o processo de inibição a partir de 2 minutos, chegando a 5 minutos sem apresentar crescimento (Quadro 6).

Na Figura 30 é possível observar o processo de inibição nos diferentes tempos de contatos que as bactérias tiveram com o agente inibidor.

**Quadro 6** – Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela).

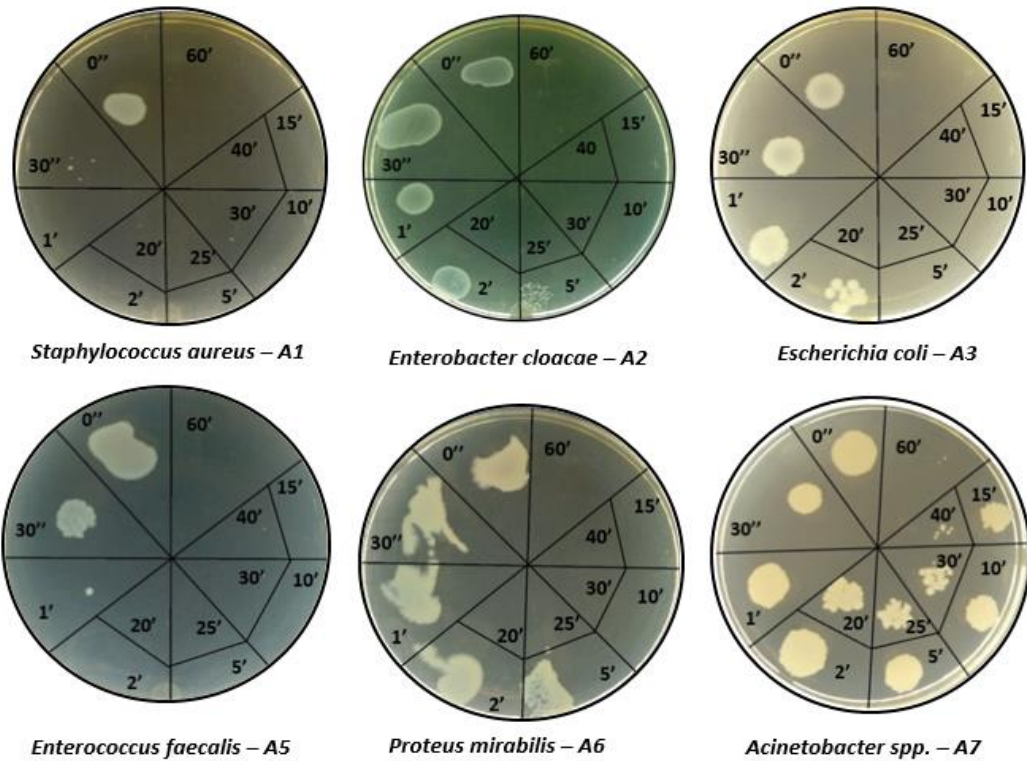
Bactéria	Óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela)											
	Tempo de Contato											
	0	30''	1'	2'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	60'
A1 <i>Staphylococcus aureus</i>	xxx	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A2 <i>Enterobacter cloacae</i>	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	o	o	o	o	o	o	o
A3 <i>Escherichia coli</i>	xxx	xxx	xxx	xx	o	o	o	o	o	o	o	o
A5 <i>Enterococcus faecalis</i>	xxx	xx	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A6 <i>Proteus mirabilis</i>	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	o	o	o	o	o	o	o
A7 <i>Acinetobacter</i>	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	x	x

Fonte: autoria própria.

Legenda: XXX – grande crescimento; XX – médio crescimento; X- pouco crescimento; O – sem crescimento.

Para o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo), a inibição das bactérias ocorreu a partir de 2 minutos, com exceção da bactéria *Acinetobacter spp* (A7), em que não houve processo de inibição em nenhum dos tempos testados, sendo esta a bactéria que se mostrou mais resistente ao agente inibidor. As bactérias *Escherichia coli* (A3) e *Enterococcus faecalis* (A5) tiveram inibição em 30 segundos, em seguida *Enterobacter cloacae* (A2) e *Proteus mirabilis* (A6) tiveram inibição a partir de 1 minuto e a bactéria *Staphylococcus aureus* (A1) em 2 minutos, conforme é possível observar no Quadro 7 e na Figura 31.

**Figura 30** - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) na concentração de 0,25%.



Fonte: autoria própria

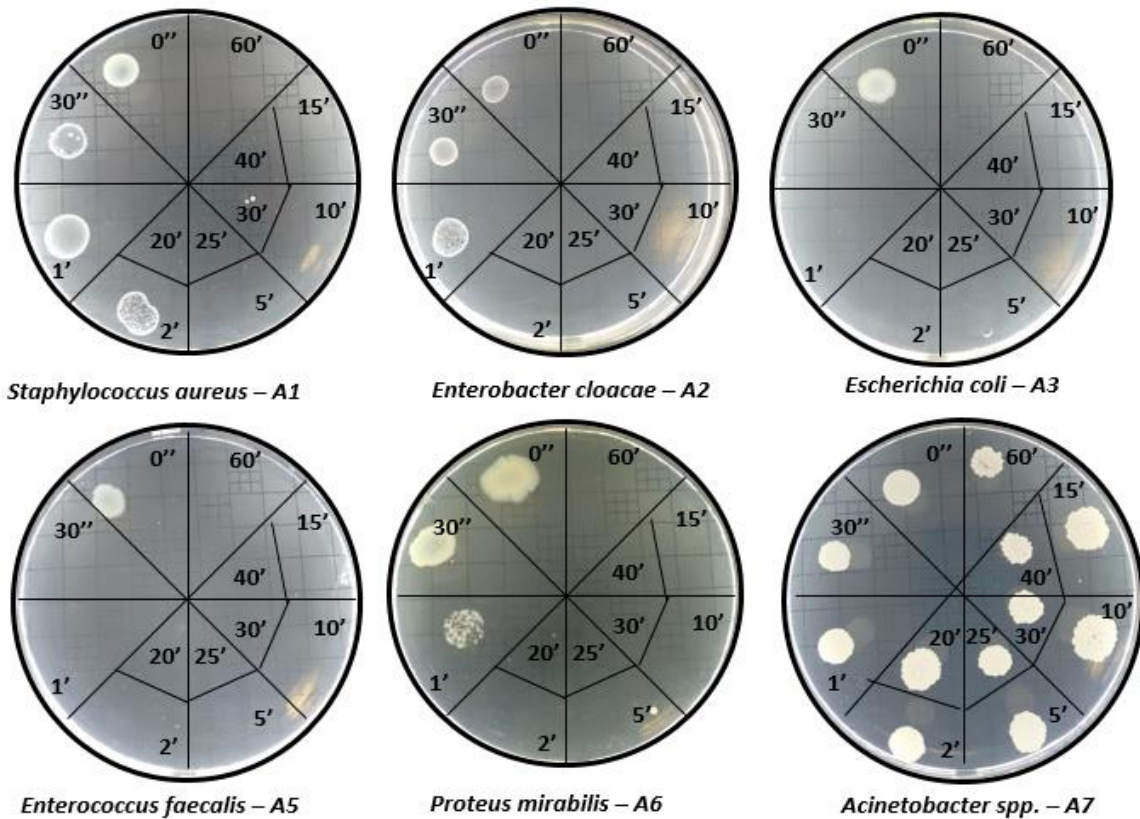
**Quadro 7** – Tempo de contato e resistência das bactérias em relação ao óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo).

Bactéria	Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo)											
	Tempo de Contato											
	0	30''	1'	2'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	60'
A1 <i>Staphylococcus aureus</i>	xxx	xxx	xxx	xx	o	o	o	o	o	o	o	o
A2 <i>Enterobacter cloacae</i>	xxx	xxx	xx	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A3 <i>Escherichia coli</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A5 <i>Enterococcus faecalis</i>	xxx	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A6 <i>Proteus mirabilis</i>	xxx	xxx	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A7 <i>Acinetobacter spp.</i>	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx

Fonte: autoria própria.

Legenda: XXX – grande crescimento; XX – médio crescimento; X- pouco crescimento; O – sem crescimento

**Figura 31** - Resultado da inibição do crescimento das bactérias em diferentes tempos de contato com o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo) na concentração de 0,25%.



Fonte: autoria própria

As bactérias utilizadas para fazer testes, como o de determinação de concentração mínima inibitória e tempo de contato por diferentes tipos de óleos essenciais, em geral, são a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, por exemplo, como nos estudos realizado por Santos et al. (2011); Almeida et al. (2014) e Silva et al. (2014). Porém, devido à grande variedade de metodologias para a realização dos testes, a verificação de evidências que demonstram a eficiência de cada óleo em relação às bactérias se torna um trabalho difícil.

### 5.5 Teste de encapsulamento de óleo essenciais *Cymbopogon winterianus* (citronela) por gelificação iônica

O óleo essencial de citronela é utilizado amplamente pela indústria no combate ao mosquito por sua aplicação como repelente. Esse é um dos fatores que tornam esse óleo mais acessível em relação ao óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavacão), que teve bons resultados nos testes de disco-difusão e tempo de contato.

Na Figura 32, é apresentado o sistema para simulação do tanque, onde o fluido de corte fica armazenado durante a usinagem, para testar a ação do óleo essencial encapsulado e adicionado diretamente ao fluido. Os reservatórios ficaram sob agitação com auxílio de agitador magnético durante o horário comercial e cobertos para não sofrer ação da luz.

**Figura 32** - Sistema de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte



**Fluido de corte+  
óleo essencial  
encapsulado**

**Fluido de corte+  
óleo essencial  
misturado**

**Fluido de corte  
contaminado sem  
adição do óleo**

Fonte: autoria própria

Foi possível observar que, após 5 minutos de funcionamento, ocorreu (i) diminuição de 30% no número de colônias no sistema em que havia óleo essencial encapsulado e (ii) de 35% (Tabela 3) no sistema mistura. Decorrida 1 hora de funcionamento dos sistemas, a diminuição no número de colônias passou a ser de 40% e 48% no sistema de cápsula e no sistema misturado, respectivamente. Após 24 horas, notou-se que houve (i) um aumento de 10% do número de colônias de



bactérias presentes no sistema com óleo encapsulado e (ii) uma redução de 53% no sistema misturado.

**Tabela 3:** Contagem de colônias bacterianas presentes no fluido de corte, no sistema de simulação de tanque.

Tempo	Sistema Encapsulado	Sistema Mistura
0 minutos	6,70x10 <sup>4</sup>	6,90 x10 <sup>4</sup>
5 minutos	5,00 x10 <sup>4</sup>	4,48 x10 <sup>4</sup>
30 minutos	4,85 x10 <sup>4</sup>	4,33 x10 <sup>4</sup>
1 hora	4,02 x10 <sup>4</sup>	3,59 x10 <sup>4</sup>
2 horas	4,1 x10 <sup>4</sup>	3,30 x10 <sup>4</sup>
4 horas	3,9 x10 <sup>4</sup>	3,45 x10 <sup>4</sup>
8 horas	3,4 x10 <sup>4</sup>	3,20 x10 <sup>4</sup>
12 horas	3,0 x10 <sup>4</sup>	3,15 x10 <sup>4</sup>
24 horas	4,69 x10 <sup>4</sup>	3,24 x10 <sup>4</sup>
34 horas	4,02 x10 <sup>4</sup>	3,93 x10 <sup>4</sup>
48 horas	2,34 x10 <sup>4</sup>	2,76 x10 <sup>4</sup>
96 horas	1,0 x10 <sup>4</sup>	1,59 x10 <sup>4</sup>

Fonte: autoria própria

Ao final de cada “jornada de trabalho”, o sistema era desligado, assim como ocorre na indústria: as máquinas-ferramentas são desligadas e reiniciam seu ciclo no dia seguinte. Nos sistemas estudados, observou-se que houve aumento do número de microrganismos onde o óleo estava encapsulado. Isso deve ter ocorrido devido ao fato de as cápsulas com óleo essencial ficarem na superfície do fluido de corte no reservatório, não havendo contato do óleo essencial com os microrganismos presentes no fundo. Essa situação não foi observada no sistema no qual foi feita a mistura do óleo diretamente no fluido.

No outro dia, com o reinício da agitação (ou seja, da mistura das cápsulas com o fluido), as bactérias voltaram a entrar em contato com o óleo e novamente ocorreu a diminuição do crescimento (análise após 34 horas). Ocorreram reduções de 40% e de 43% no sistema encapsulado e misturado respectivamente. No tempo de 48 horas, a redução do número de colônias nos sistemas estudados foi de 65% para o sistema cápsula e 60% para o sistema mistura.

Ao final do experimento (96 horas), 15% do total inicial de bactérias permaneceram no sistema com óleo encapsulado. A redução desses

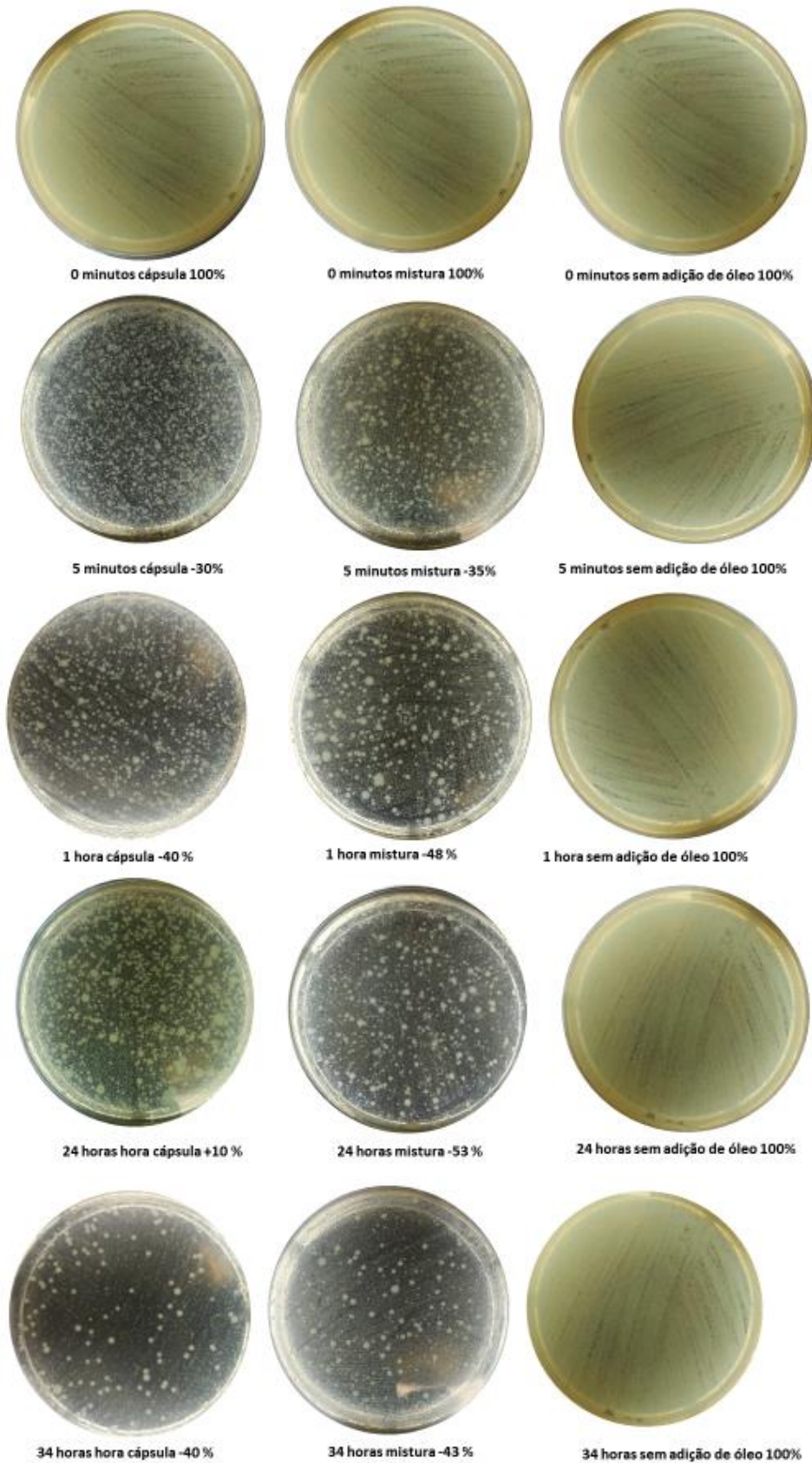
microrganismos ocorreu de forma gradual, no sistema, conforme as análises foram sendo realizadas. No sistema em que o óleo foi misturado diretamente permaneceram 23% do número inicial de bactérias.

Percebeu-se, ao longo do experimento, no sistema encapsulado, uma redução mais lenta da quantidade de colônias, o contrário do que ocorreu no sistema misturado. Isso indica que, no encapsulado, o óleo pode ter sido liberado mais lentamente, como relatado nos trabalhos de HOLKEM et al. (2015) e BENAVIDES et al. (2016). No misturado, a diminuição do crescimento foi mais rápida no início e, ao final, a porcentagem de remoção das bactérias foi menor, o que pode estar relacionado com a volatilização do óleo essencial, como destacado por Benavides et al. (2016).

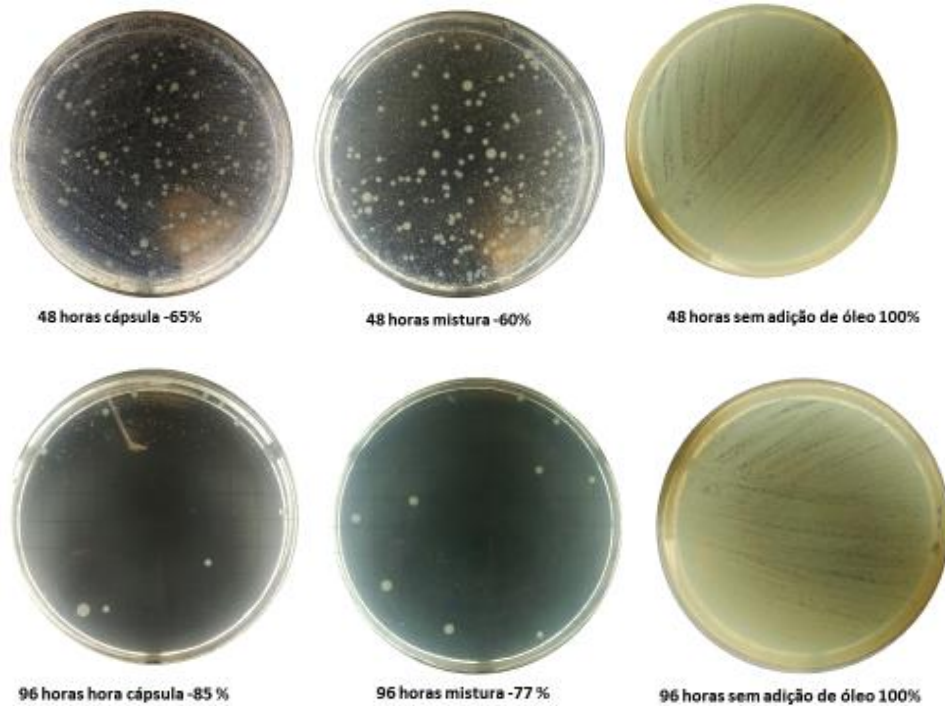
Após a finalização dos testes, realizou-se a identificação morfotintorial das bactérias que cresceram nos reservatórios e constatou-se a presença, no sistema, de três grupos de bactérias: duas eram Gram-negativas, apresentando-se na forma de bacilos e estafilococos, e uma bactéria era Gram-positiva, apresentando formato de cocos.

Na Figura 33, pode-se observar o resultado do crescimento das bactérias nas placas de Petri após transcorrido o tempo de contato do óleo essencial encapsulado ou misturado presente no tanque de armazenamento.

**Figura 33** - Resultado do crescimento de bactérias em placas de Petri nos sistemas de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte.



Continuação **Figura 34** - Resultado do crescimento de bactérias em placa de Petri nos sistemas de simulação de tanque de armazenamento de fluido de corte.



Fonte: autoria própria

Devido ao fato de o óleo essencial estar encapsulado, as suas propriedades, como a de ser antimicrobiano, permanecem preservadas por mais tempo, já que a volatilização do óleo é mais lenta. Assim a ação do óleo essencial misturado diretamente ao fluido de corte se torna mais eficiente em um curto período de tempo, em relação ao modo encapsulado, por permanecer mais tempo em contato com as bactérias.

O fato de a redução das bactérias, no modo encapsulado, ter sido menor e por ter havido aumento do número de bactérias em um dos tempos analisados, demonstra que a sua eficiência - a longo prazo - pode ser superior ao óleo essencial misturado diretamente no fluido de corte. Isso pode ocorrer pelo encapsulado estar “protegido” e por permanecer mais tempo disponível no sistema.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi observado que há um número grande de colônias bacterianas heterotróficas e potencialmente patogênicas presentes no fluido de corte.
- Neste trabalho, o número de bactérias potencialmente patogênicas Gram-negativas foi maior que o número de bactérias Gram-positivas e essas foram as que apresentaram maior resistência ao tratamento com os antimicrobianos testados.
- O alfavacão foi o óleo essencial que apresentou melhores resultados em relação aos testes de disco-difusão e de tempo de contato.
- Conclui-se ainda que a maior eficiência do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela) se deu na forma encapsulada. Nessa forma, houve a redução no número de microrganismos, mas as duas formas de dispersão do óleo essencial foram satisfatórias no processo de redução dos microrganismos no sistema.
- Os resultados com o desenvolvimento do trabalho podem vir a contribuir de forma significativa para a economia das indústrias de usinagem. Eles possibilitam aumento na vida útil da emulsão utilizada, reduzindo gastos com compra, preparação, manutenção e tratamento do fluido de corte, diminuindo também problemas de saúde causados tanto pelos microrganismos como pelos biocidas químicos que atualmente são utilizados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIBOYE, T. O. MOHAMMED, A. O. BELLO, S. A. YUSUF, I. I. IBITOYE, O. B. MURITALA, H. F. ONAJOBI, I. B. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. **Microbial Pathogenesis**. v. 95, p. 208–215. 2016.
- ALMEIDA, A.C. OLIVEIRA, L. PAULO, P. D. MARTINS, E. R. SOUZA, R. M. FIGUEREDO, L. S. SANTOS, C. A. 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 ciências veterinárias**. v. 20, n. 4, p. 248-251. 2013.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de Cinnamomum zeylanicum, Cymbopogon nardus, Zingiber officinale: Caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. Dissertação (Mestrado). 2010. Universidade Federal de Lavras.
- ANDRADE, M. A. CAR SOSO, M. G. BATISTA, L. R. MALLERT, A. C. T. MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de Cymbopogon nardus, Cinnamomum zeylanicum e Zingiber officinale: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANVISA- Agencia nacional de vigilância sanitária  
<[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/interpretacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm)>. Acessado em 23 de novembro de 2016.
- ASCHERI, P. R. MARQUEZ, M. O.M. MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: Seleção de material de parece. **Ciência, tecnologia e alimento**. v. 23. p. 1-6.2003.
- BENAVIDES, S. CORTÉS, P. PARADA, J. FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry** v. 204 p.77–83. 2016.
- BURTON, G. GOO, C. S. ZHANG, Y. JUN, M. B. G. Use of vegetable oil in water emulsion achieved through ultrasonication as cutting fluids in micro-milling. **Journal of Manufacturing Processes**.v.16 p.405–413. 2014.
- CATALANO, A. LUCIANI, R. CAROCCI, A. CORTESI, D. POZZI, C. BORSARI, C. FERRARI, S. MANGANI, S. X-ray crystal structures of *Enterococcus faecalis* thymidylate synthase with folate binding site inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.123, p.649-664. 2016.
- CORTÉS-RAJA, D. F. SOUZA, D. R. F. OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v,4. Ed. 2,p.90–96. 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S15 (ISBN 1- 56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 51. p.133 – 138, 2003.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. M100 – S15. Vol. 25. Nº1. January 2013.

CONSTANTINIU, S. ROMANIUC, A. IANCU, L. S. FILIMON, R. TARAȘI, I. Cultural and biochemical characteristics of acinetobacter spp. Strains isolated from hospital units. **The journal of preventive medicine**. v.2 (3-4). p.35-42 35. 2004.

DEBNATH, S. REDDY, M. M. YI, Q. M. Environmental friendly cutting fluids and cooling techniques in machining: a review. **Journal of Cleaner Production**. v.83. p. 33-47, 2014.

DEVI, K. P. NISHA, S. A. SAKTHIVEL, R. PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**.v130, ed. 1,p.107–115. 2010.

FERRAZ, I. D. K. CAMARGO, J. L. C. SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* AUBL . e *Carapa procera* D. C.): ASPECTO S BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS E TECNOLÓGICOS. **Acta Amazônica**. v.32(4).p.647-661.2002.

Ferreira, J. C. **Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Tecnológica do Paraná.

GARCIA, A. P. RODRIGUEZ, F. M . Enterobacterias.. **Medicine**. v.10(51). p.3426-31. 2010.

GILBERT, Y. VEILLETTE, M. DUCHAINE, C. Metalworking fluids biodiversity characterization. **Journal applied microbiology**. v. 108. p. 437-449. 2010.

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

GUÉRIN, F. Infections à *Enterobacter cloacae* complex : résistance aux antibiotiques et traitement. **Journal des Anti-infectieux**. v.17,p. 79–89. 2015.

HOLKEM, A. T. CODEVILJA, C; F. MENEZES, C. R. Emulsificação/gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. *Ciência e Natura*, Santa Maria. Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos v. 37. p, 116-124. 2015.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR. BD CHROMagar Orientation Medium PA-257481.03 Rev.: Sep 2011.

JAIN, H. MULAY, S. MULLANY, P. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. **Gene Reports**. v.5, p.112–116. 2016.

KRAINIK, P. RASHID, A. PUSAVEC, F. YUI, A. NIKKAM, N. TOPRAK, M. Transitioning to sustainable production – part III: developments and possibilities for integration of nanotechnology into material processing technologies. **Journal of Cleaner Production**. V.112, p. 1156-1164, 2016.

KWIECIŃSKI, J. EICK, S. WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V.33,p.343–347. 2009.

LEIMANN, F. V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. Dissertação (Mestrado).2008 Universidade Federal de Santa Catarina.

LI, LIXIANG. LI, K. WANG, Y. CHEN, C. XU, Y. ZHANG, L. HAN, B. GAO, C. TÃO, F. MA, C. XU, P. Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. **Metabolic Engineering**. v.28,p.19–27. 2015.

LIU, H. M. WU, Y. S. WU, C. C. Occupational Exposure to Chromium and Nickel in Metalworking Fluid Operations Environment. **International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental**. Vol. 35, p34. 2012.

LODDERS, N. KÄMPFER, P. A combined cultivation and cultivation-independent approach shows high bacterial diversity in water-miscible metalworking fluids. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 35. p. 246–252, 2012.

MACHADO, A. R. ABRÃO, A. M. COELHO, R. T. SILVA, M. B. Teoria da usinagem dos materiais. 3 ed. São Paulo: Blucher, 2015.

MARCO, C. A. INNECCO, R. MATTOS, S. H. BORGES, N. S. S.B. MEDEIROS FILHO, S. Influência de espaçamento, altura e época de corte no rendimento da biomassa e óleo essencial na cultura de capim citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt. **Revista Ciência Agrônômica**, v.37, n.1, p.32-36, 2006.

MATIAS, E.F.F. SANTOS, K.K.A. ALMEIDA, T. S. COSTA, J. G. M. COUTINHO, H. D. M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v,1, p. 57-60. 2011.

MENDONÇA, A. P. FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**. v. 37(3). P.353 – 364. 2007.



Metal Working Fluids: Recommendation for Chronic Inhalation Studies. **National Institute for Occupational Safety and Health Cincinnati**. 2001.

MOON, S. E. KIM, H. Y. CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**. v,56, ed. 9. P.907–916. 2011.

MORAIS, L. R. B. Química de oleaginosas: valorização da biodiversidade amazônica. **Chemistry of vegetable oils : valorization of the amazon biodiversity**, 2012.

MOREIRA, A.C. G. **Microencapsulação de Óleos Essenciais**. Dissertação (Mestrado).2014 Universidade do Porto.

MURAT, J. B GRENOUILLET, F. REBOUK, G. PENVEN, E. BATCHILI, A. DALPHIN, J. C. THAON, I. MILLON, L. Factors influencing the microbial composition of metalworking fluids and potencial implications for machine operator's lung. **Applied Environmental microbiology**. V.78. p.34-41. 2012.

NAKAMURA, T.U. MENDONÇA FILHO, R.R. MORGADO-DIAZ, J. A. MAZA, P. K. DIAS FILHO, B. P. CORTEZ, D. A. G. ALVIANO, D. S. ROSA, M. S.S. LOPES, A. H. C.S. ALVIANO, C. S. NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**. v,55,p. 99–105. 2006

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

National Institute for Occupational Safety and Health Cincinnati OH USA – Niosh. Metal Working Fluids Recommendation for Chronic Inhalation Studies. 2001.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

OLIVEIRA, M. S. Tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Resistente a carbapenem. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

OSTROSKY, E.A. MIZUMOTO, M. K. LIMA, M. E. L. KANEKO, T. M. NISHIKAWA, S. O. FREITAS, B. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de farmacognosia**. v.18. n. 2. 2008

PANDEY, A. K. SINGH, P. TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v,4, p.682-694. 2014.

PASSMAN, F. J. Understanding four significant factors can help control microbial contamination in metalworking operations. **Tribology & lubrication technology**. 2004.

PASSOS, M. G. CARVALHO, H. WIEST, J. M. Inibição e inativação in vitro de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.11, p.71-78, 2009.

PINTO, A.A.S. **SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FLUIDO DE CORTE A BIOCIDA SINTÉTICO E NATURAL**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

PEREIRA, A. A. CARDOSO, M. G. ABREU, L. R. MORAIS, A. R. GUIMARÃES, L. G. L. SALGADO, A. P. S. P. Caracterização Química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Ciências e agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PRASANNABALAJI, N. MURALITHARAN, G. SIVANANDAN, R. N. KUMARAN, S. Antibacterial activities of some Indian traditional plant extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. p. 291-295. 2012.

RAHMAN, A. KANG, S. C. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of erigeron ramosus (walt.) B.S.P. **Journal of Food Safety**. v.29. p. 176–189. 2009.

RYU, B. KIM, H. M. WOO, J. H. CHOI, J. H. JANG, D. S. A new acetophenone glycoside from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (cloves). **Fitoterapia**. v.115, p.46–51. 2016.

SAHA, R. DONOFRIO, R. S. The microbiology of metalworking fluids. **Applied microbiology and biotechnology**.v. 94, ed 5, p. 1119-1130, 2012.

SANTOS, A. L; SANTOS, D. O. FREITAS, C. C. FERREIRA, B. L. A. AFONSO, I. F. RODRIGUES, R. R. CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Revista Brasileira de Patologia Medica e Laboratorial**.v. 43. n. 6.p. 413-423.2007

SELVARAJU, S. KHAN, I. U. H. YADAV, J. S. Biocidal Activity of Formaldehyde and Nonformaldehyde Biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in Pure and Mixed Suspensions in Synthetic Metalworking Fluid and Saline. **Applied and environmental microbiology**, p. 542–546, 2015.

Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral, SGM. Anuário Estatístico: Setor Metalúrgico 1995 – Brasília, 2014.

SHARMAN, A. K. TIWARI, A. K. DIXIT, A. R. Effects of Minimum Quantity Lubrication (MQL) in machining processes using conventional and nanofluid based cutting fluids: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**. v.127. p.1-18. 2016.

SHOKRANI, A. DHOKIA, V. NEWMAN, S.T. Environmentally conscious machining of difficult-to-machine materials with regard to cutting fluids. **International Journal of Machine Tools & Manufacture**. v.57, p. 83-101, 2012.

SHOKOOHI, Y.KHOSROJERDI, E. SHIADHI, B. H. R. Machining and ecological effects of a new developed cutting fluid in combination with different cooling techniques on turning operation. **Journal of Cleaner Production**. v.94, p. 330-339, 2015.

SILVA, L .L. HELDWEIN,, C. G. REETZ, L. G. B. HÖRNER, R. MALLMANN, C.A. HEINZMANN, B. M.Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.20(5), p. 700-705, 2010.

SILVA, M.T.N. USHIMARU, P.I. BARBOSA, L.N. CUNHA, M.L.R.S.FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.257-262, 2009.

SILVA, A. A. BERGAMO, L. CAMARGO, L. P. FERNANDES, C. MUSSATO, D. CANAZART, D. FILHO, B. A.A. Atividade microbiológica de óleos essenciais obtidos por arraste. **Revista UNINGÁ Review**. v.20,n.3,p.33-39. 2014.

SILVEIRA, S. M, CUNHA JR. A, SCHEUERMANN, G. N, SECCHI, F.L, VERRUCK, S, KROHN,M. VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v, 71(3). p. 471-80. 2012.

SILVESTRI, J. D. F. PAROUL, N. CZYEWski, E. LERIN, L. ROTAVA, I. CANSIAN, R. L. MOSSI, A. TONIAZZO, G. OLIVEIRA, D. TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594. 2010

SOUZA, C. R. Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; p. 21. **Embrapa Amazônia Ocidental. Documento**; 48. 2006.

STEFANAKIS, M. K. TOULOUPAKIS, E. ANASTASOPOULOS, E. GHANOTAKIS, D. KATERINOPOULOS, H. E. MAKRIDIS, P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**. v.34.n.2.p.539-546. 2013.

STUART, C. H. SCHWARTZ, S. A. BEESON, T. J. OWATZ, C. B. Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**. v.32, ed. 2, p. 83-172. 2006

SULIMAN, S. M. A. ABUBAKR, M. I. MIRGHANI, E. F. Microbial contamination of cutting fluids and associated hazards. **Tribology International**. v. 30. p. 753–757, 1997.

- TESSARO, E. P. **Avaliação de processo oxidativo para o tratamento ambientalmente adequado de fluido de corte**. 2008. Dissertação Mestrado. São Carlos. Programa de Pós-graduação do Instituto e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- TRAFNY, E. A. LEWANDOWSKI, R. KOZLOWSKA, K. MARCINIAK, I. Z. STEPIŃSKA, M. Microbial contamination and biofilms on machines of metal industry using metalworking fluids with or without biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 99.p. 31e38, 2015.
- TRAFNY, E. A. LEWANDOWSKI, R. MARCIANIAC-ZAWISTOWSKA, I. STEPINSK, M. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganism in metalworking fluids. **World J Microbiol Biotechnol**. v.23.p 1635-1643. 2013.
- TRAJANO, V. N. LIMA, E. O. SOUZA, E. L. TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V.9. p.542-545, 2009.
- UPADHYAY, A. BHAGWAT, D. In Vitro Antioxidant Activity and In Vivo Antidepressant-like Effect in Mice of the Ethanolic Extract from Leaves of *Ocimum gratissimum* Linn. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**. v. 13 (3). p. 297. 2014.
- VAN DER GATS, C. WHITELEY, A.S. LILLEY, A. K. KNOWLWES, C. J. THOMPSON. I.P Bacterial community structure and function in a metal working fluid. **Environmental microbiology**. v. 5. p.453-461. 2003.
- VEILETTE, M., THORNE, P.S., GORDON, T., DUCHAINE, C. Six Month Tracking of Microbial Growth in Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging. **Ann. occup. Hyg**. v. 48, p.541-546, 2004.
- VIJAY, V.YEATTS JÚNIOR, J. L. RIVIERE, J. E. BAYNES, R. E. Predicting dermal permeability of biocides in commercial cutting fluids using a LSER approach. **Toxicology Letters**. v. 175. p.34-43. 2007.
- XAVIOR, M. A. ADITHAN, M. Determining the influence of cutting fluids on tool wear and surface roughness during turning of AISI 304 austenitic stainless steel. **journal of materials processing technology**. v. 2 0 9, p.900-909, 2009.
- WINTER, M. BOCK, R. HERMANN, C. STACHE, H. WICHMANN, H. BAHADIR, M. Technological evaluation of a novel glycerol based biocide-free metalworking fluid. **Jornal of Cleaner Production**. v.35. p.176-182. 2012.