

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ANÁLISE DO EFEITO INIBITÓRIO DE AMINOALCOÓIS EM CEPA DE *Staphylococcus aureus*

Erick José Nogueira de Andrade¹, Paula Macedo Rodrigues², Maiara Lima
Castilho¹.

¹Laboratório de Bionanotecnologia, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 –

São José dos Campos - SP, Brasil

²Departamento Técnico, Yushiro do Brasil - Indústria Química Ltda, Avenida Henry Nestlé, 3100,
Bairro do Grama - 12287-260 – Caçapava-SP, Brasil

eriick.n.andrade@gmail.com, paula.yushiro@gmail.com, mcastilho@univap.br.

Resumo

Na indústria metal mecânica, os fluidos de corte solúveis em água são mais comumente utilizados nos processos de usinagem de metais. Entretanto, sua composição de água, óleo e aditivos, favorecem a proliferação de microrganismos, principalmente bactérias, sendo a principal causa de descarte prematuro das emulsões. Para prolongar a vida útil dos fluidos de usinagem, as formulações precisam de componentes resistentes a degradação microbiológica. Os aminoalcoóis são aminas primárias com amplo registro em fluidos de corte, apresentando eficiência em estabilizar o pH e inibir corrosão. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade bacteriostática de aminoalcoóis contra *Staphylococcus aureus*, utilizando a técnica de concentração inibitória mínima com prévia caracterização da cepa ATCC por coloração de gram. Os resultados evidenciaram que aminoalcoóis possuem efeito bacteriostático promissor em cepa de *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Aminoalcoóis. Fluidos de corte. *Staphylococcus aureus*. Indústria metal mecânica.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

A indústria metal mecânica é o segmento responsável pela transformação e conformação de metais. Em todos os processos de usinagem de metais, é necessário o uso de fluidos de corte, estes são subdivididos em solúveis em água (convencionais de base mineral, semissintéticos ou sintéticos), integrais ou MQL (Mínima Quantidade de Lubrificantes). O mais comum em processos metalúrgicos é o fluido de corte solúvel em água, com a função de refrigerar, lubrificar, proteger contra oxidação e limpar a região da usinagem (BRINKSMEIER E, 2015). Entretanto, a contaminação microbiológica dessas emulsões ou soluções são a principal causa do descarte prematuro, provocando instabilidade e alterações na performance da emulsão ou solução, além de poder causar riscos para a saúde de operadores, principalmente infecções dermatológicas e respiratórias (GRUB, 2013; SOUZA, 2019).

Devido a sua formulação (óleo, água e aditivos), os fluidos solúveis de base mineral e ou semissintéticos apresentam condições favoráveis ao crescimento de microrganismos, os compostos orgânicos das formulações também servem como nutrientes para as bactérias, inclusive as patogênicas, elevando os riscos à saúde de trabalhadores. Para solucionar o problema da contaminação dos fluidos, ampliando sua vida útil, são utilizados biocidas e fungicidas tanto nas formulações como em manutenções preventivas, porém, além dessas substâncias possuírem elevado custo, normalmente são tóxicas (CANTER NEIL, 2019).

Prolongar a vida útil dos fluidos de usinagem é essencial para a indústria, assim, as formulações precisam de componentes resistentes à degradação microbiológica. Em geral, os fluidos de usinagem solúveis em água devem manter uma faixa alcalina de pH entre 9,0 a 10,0 para evitar corrosões em ferramentas e equipamentos mecânicos, além de reduzir a contaminação bacteriana. O pH das emulsões é principalmente influenciado pela proliferação de microrganismos, em que as vias metabólicas dos mesmos liberam íons H⁺ na emulsão, diminuindo o pH (BRINKSMEIER E, 2015; LUIZ, R.V, 2015).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

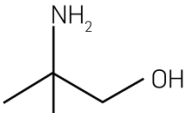
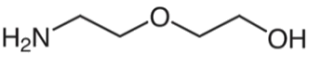
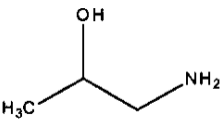
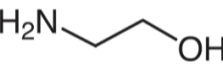
Os fluidos de usinagem a base de aminas são diretamente responsáveis em manter a alcalinidade tanto no produto concentrado como em sua diluição em água. Portanto, desenvolver formulações com aminas de maior bio resistência são formas de aumentar a vida útil dos fluidos de usinagem e melhorar a sinergia do processo produtivo com o meio ambiente. As aminoalcoóis primárias possuem amplo registro em fluidos de corte como eficientes estabilizadoras de pH e inibidores de corrosão. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a ação inibitória de aminoalcoóis primários em cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a fim de serem melhor empregadas nas formulações de fluidos de cortes industriais.

Metodologia

Diluições dos aminoalcoóis primários

Os aminoalcoóis primários utilizados no experimento inibitório de *S. aureus* estão descritos na Tabela 1, os quais foram previamente diluídos em água ultrapura a uma concentração de 512 µg/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição dessa solução mãe com água ultrapura para a concentração final de 16 µg/mL, sendo está utilizada durante os experimentos.

Tabela 1 - Aminoalcoóis primários utilizados nos experimentos inibitórios de *S. aureus*.

Nomenclatura	Estrutura química	Fornecedor/ Distribuidor
2-amino-2-metil-1-propanol (AMP)		Aruba Brasil
2-(2-aminoetoxi) etanol (DGA)		Huntsman Química
1-amino-2-propanol (MIPA)		Bandeirante Química
2-aminoetanol (MEA)		Bandeirante Química
Corrguard FS (FS)	Mistura de aminoalcoóis primárias	Aruba Brasil

Fonte: Os autores (2023).

Cultura Bacteriana

A cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion - Kasvi®) por 24 horas, com posterior repique para o ágar BHI por meio da semeadura por esgotamento e incubada por mais 24 horas a 35°C em estufa bacteriológica. A preparação do inóculo foi realizada por meio do turbidímetro Densichek (Biomérieux®), em que 3 colônias isoladas foram alçadas e suspensas em solução fisiológica estéril para padronização na escala 0,5 McFarland.

Coloração de Gram

A caracterização da bactéria foi realizada por meio do procedimento de coloração de Gram, em que a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi fixada em uma lâmina e corada primeiramente com violeta-de-metila por 1 minuto. Em seguida foi feito uma lavagem e realizou-se a coloração com lugol por 1 minuto. Após este período a lâmina foi lavada com álcool por 30 segundos para retirar o excesso de corante e por último foi corada com safranina por 1 minuto, sendo observada a estrutura em um microscópio óptico utilizando a objetiva de 100x com óleo de imersão.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

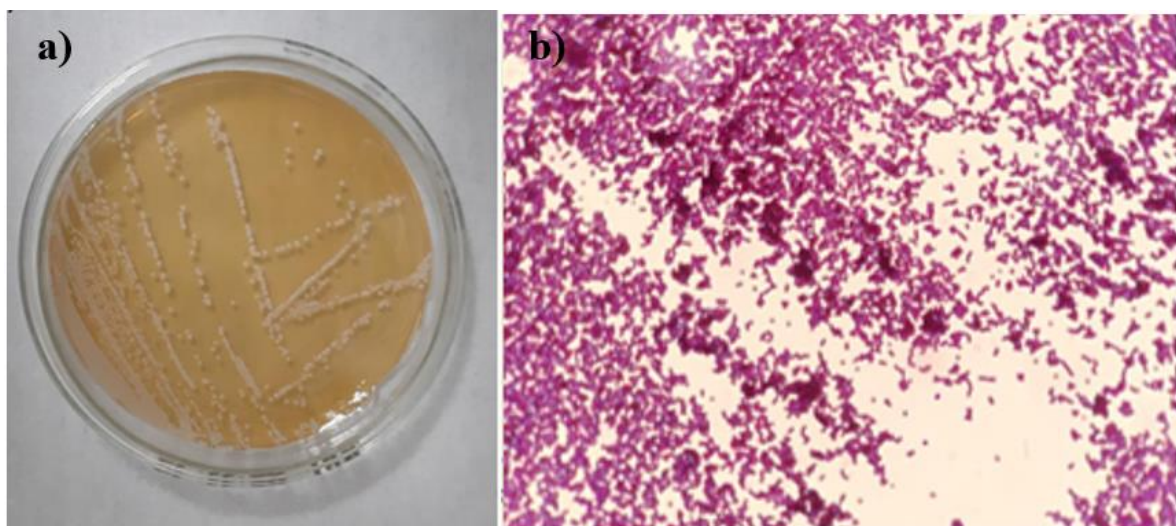
Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração Inibitória Mínima (CIM) avalia a capacidade bacteriostática do tratamento perante a bactéria e determina a menor concentração da solução capaz de inibir o crescimento bacteriano baseado nas diretrizes descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, M7-A9), a qual utiliza o método de microdiluição em caldo. A suspensão de 10^6 UFC/mL de cepas *S. aureus* previamente padronizada foram expostas a diferentes concentrações das soluções amins. A microdiluição das diferentes soluções amins foi realizada em caldo Mueller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia), partiu de uma concentração inicial de 4 µg/mL em placa de 96 poços. Um controle de contaminação, o grupo controle negativo foi realizado utilizando a menor concentração proveniente da diluição seriada de cada uma das soluções amina sendo adicionada ao caldo. Um grupo de crescimento bacteriano também foi utilizado sendo o controle positivo experimental. A placa de 96 poços foi então incubada na estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas. Após esse período, a análise da CIM foi realizada utilizando o método de turvamento e confirmada por leitura no espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, EUA), o qual foi disponibilizado pelo laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Resultados

A Figura 1 mostra o crescimento bacteriano da cepa de *S.aureus* cultivadas em meio de enriquecimento BHI, juntamente com o teste de coloração de Gram (Figura 1b). O método de semeadura por esgotamento foi utilizado para o crescimento microbiológico, o qual possibilitou uma boa distribuição de crescimento formando colônias isoladas e puras garantindo a identificação os microrganismos que cresceram no meio (Figura 1a). A coloração de Gram é um passo muito importante na caracterização e classificação inicial das bactérias, assim na Figura 1b mostra a coloração da cepa padrão de *S. aureus*. Observa-se a retenção do corante violeta devido a presença de uma espessa camada de peptidoglicano em suas paredes celulares sendo característico de bactérias gram-positivas.

Figura 1 - Cultura bacterina da cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). a) Crescimento em meio BHI; b) Micrografia obtida com objetiva de 100x da coloração de gram.

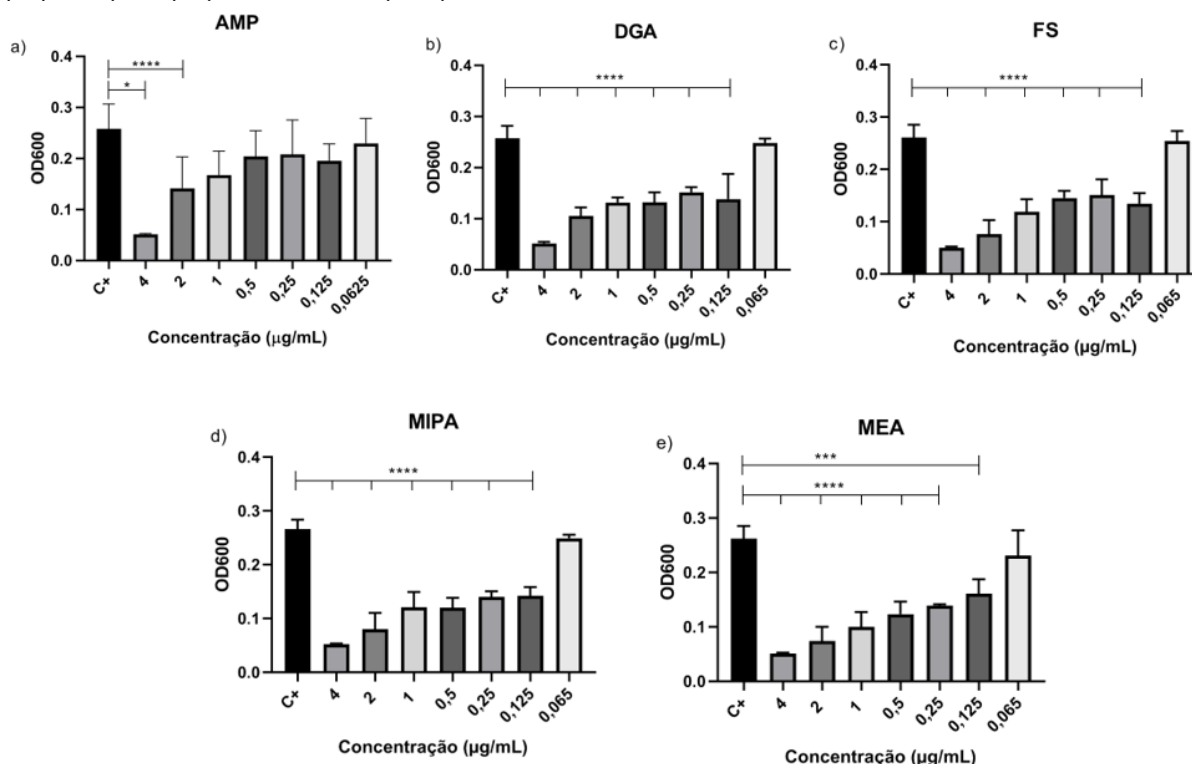


Fonte: Os autores (2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A análise do efeito inibitório das soluções de aminoalcoóis primários foram realizados por meio da CIM como mostrado na Figura 2. Todos os grupos testados apresentaram resultados de redução significativa de crescimento microbiológico nas concentrações entre 4 a 0,125 µg/mL. Entretanto não foi observado efeito significativo na concentração de 0,065 µg/mL em nenhuma das amostras.

Figura 2 - Determinação experimental da CIM de soluções de aminoalcoóis primários em cepa de *S. aureus*. a) 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP); b) 2-(2-aminoetoxi) etanol (DGA); c) Corrguard FS (FS); d) 1-amino-2-propanol (MIPA); e) 2-aminoetanol (MEA).



Fonte: Os autores (2023).

Discussão

O método de coloração de Gram é utilizado para identificação das bactérias com base nas propriedades físicas e químicas da parede celular, sendo muito utilizado como um dos critérios para a identificação do gênero e espécie da cepa (GREGERSEN, 1978). A cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) mostrada na Figura 1b apresenta uma coloração roxa característica das bactérias Gram-positivas e morfologia em forma de cocos. A estrutura das bactérias Gram-positivas se divide em duas camadas, sendo a parede celular simples e espessa da membrana plasmática que são compostas por aproximadamente 90% de peptidoglicano, a qual retém o cristal violeta apresentando uma coloração roxa, além de conter proteínas e ácidos teicóicos em sua composição, o qual corrobora com os resultados encontrados (TRABULSI, ALTERTHUM 2008).

Dentre as diversas classes de substâncias orgânicas, os compostos nitrogenados se destacam por apresentarem importância biológica, farmacológica e industrial. Apresentam também grande importância como intermediários de sínteses (DUARTE, 2010). Aminas primárias são formadas pela substituição de um hidrogênio da amônia por um radical orgânico. Os aminoalcoóis são compostos, tais como etanolaminas, que são simultaneamente álcool e aminas, a qual se torna uma importante classe química em que se encontram presentes em um vasto grupo de substâncias naturais e sintéticas que possuem atividade biológica (FERNADES, 2012).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A determinação da concentração inibitória mínima utilizando diferentes grupos de aminoalcoóis primários mostrou ótimos resultados nas concentrações de 4 a 0,125 µg/mL em comparação com o controle positivo, com exceção a substância AMP que apresentou boa inibição apenas com 4 e 2 µg/mL, com maior crescimento bacteriano nas concentrações de 1 a 0,125 µg/mL. Dentre os aminoalcoóis testados, o FS apresentou uma redução significativa para quase todas as concentrações testadas. Este resultado observado por estar correlacionado a sua formulação, em que a composição é uma mistura de cinco tipos de aminoalcoóis primárias, sendo $\geq 52\%$ 2-amino-2-metil-1-propanol, $\geq 52\%$ 2-amino-1-butanol, $\leq 7\%$ 2-metilamina-2-metil-1-propanol, $\leq 5\%$ 2-amino-2etil-1,3-propanodiol, $\leq 6\%$ 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol. Embora o mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido, uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos, os compostos testados apresentam resultados significativos para serem incorporados em fluidos de cortes industriais com grandes capacidades bacteriostáticas.

Conclusão

Os aminoalcoóis analisados foram avaliados e apresentaram uma atividade inibitória utilizando a técnica de concentração inibitória mínima contra cepa de *S.aureus*. Os compostos FS, MEA e MIPA apresentaram resultados significativos no teste CIM, principalmente nas concentrações de 4 a 1 µg/mL, evidenciando que os aminoalcoóis possuem efeito bacteriostático promissor em cepa de *S.aureus*. Baseado nos resultados encontrados sugere-se a utilização destes compostos na incorporação de fluidos de usinagem, sendo classificados como importantes blocos construtores em sínteses orgânicas.

Referências

- BRINKSMEIER, E. et al. **Metalworking fluids—Mechanisms and performance**. CIRP annals manufacturing technology, v. 64, n. 2, p. 605–628, 2015.
- CANTER NEIL. **Metalworking fluids: The quest for bioresistance**. Society of Tribologists and Lubrication Engineers, 2019.
- DUARTE, P. D.; SANGI, D. P.; CORREA, A. **Síntese de Compostos N-Heterocíclicos Empregando Microondas**. Revista Virtual de Química, p. 204–213, 2010.
- Fernandes, F. de S. **Síntese, caracterização e avaliação biológica de aminoálcoois lipofílicos acoplados a carboidratos, candidatos a novos agentes antituberculose**. Juiz de Fora, 2012.
- GREGERSEN, T. **Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria**. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v. 5, n. 2, p. 123–127, 1978.
- GRUB, A. M. **Avaliação do desempenho de fluidos de corte contaminados no processo de torneamento do aço inoxidável austenítico**. Universidade Federal de Uberlândia, V304UF. v. 130, 2013.
- LUIZ, R. V. **Síntese enzimática e caracterização de alcanolamidas a partir de aminoalcoóis e posterior avaliação de sua aplicação como inibidor de corrosão de aço carbono AISI 1020 em fluidos de corte semissintéticos**. Universidade de São Paulo. 2015.
- SOUZA, G. **Avaliação dos ganhos econômicos e ambientais da aplicação de radiação ultravioleta para o controle de contaminação microbiológica de fluido de corte de usinagem**. Uninove, 2019.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Yushiro do Brasil por fornecer as amostras de amins para realização deste trabalho, bem como as especificações técnicas de cada amostra.