

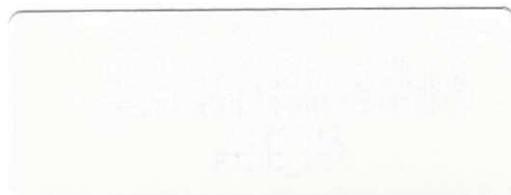


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS – PB



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha piperita L. SOBRE Salmonella enteridis, Escherichia coli,
Listeria monocytogenes e Staphylococcus aureus

CAMILA CARNEIRO MONTEIRO DOS SANTOS



PATOS-PARAÍBA
2011

CAMILA CARNEIRO MONTEIRO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha piperita L. SOBRE *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*,
Listeria monocytogenes e *Staphylococcus aureus***

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Campina Grande, Campus de Patos,
para a obtenção do Grau de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. M.Sc. Rosália Severo de Medeiros

PATOS-PARAÍBA

2011



Biblioteca Setorial do CDSA. Agosto de 2022.

Sumé - PB

S237 a
2011

Santos, Camila Carneiro Monteiro dos

Atividade antibacteriana de óleo essencial de *Mentha piperita* L. Sobre *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* / Camila Carneiro Monteiro dos Santos.- Patos-PB: UFCG, CSTR, UACB, 2011.

31p.: il.

Bibliografia

Orientadora: Rosália Severo de Medeiros

Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)

1 -Plantas medicinais2 - Óleos essenciais. 3 - Hortelã Pimenta -
AçãoAntibacteriana. I - Título.

CDU:633.88



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS - PB



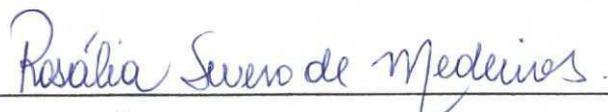
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha piperita L. SOBRE Salmonella enteridis, Escherichia coli,
Listeria monocytogenes e Staphylococcus aureus

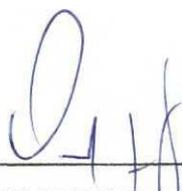
CAMILA CARNEIRO MONTEIRO DOS SANTOS

ORIENTADORA: Prof. M.Sc. ROSÁLIA SEVERO DE MEDEIROS

Monografia aprovada em 16/06/2011 como parte das exigências para à obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Comissão Examinadora composta por:



Profa. ROSÁLIA SEVERO DE MEDEIROS (UACB/UFCG)
Orientadora



Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES – (UACB/UFCG)
1ª Examinador



Prof. Dr. VICENTE QUEIROGA NETO (UACB/UFCG)
2º Examinador

Patos (PB), 30 de Junho de 2011

Que importa a **rota**?
Voa e canta enquanto lhe **resistirem** as asas.

(Menotti Del Pichia)

Dedico

A Deus, pela realização deste trabalho.
A minha família, em especial aos meus pais, Márcia e Diércules pelo o
amor e apoio sempre.

“Começo a fazer meus primeiros vôos. Não sei ao certo onde vou chegar.
Mas você estava certo. Tenho asas para voar.”

(A Vida é Feita de Escolhas)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me proporcionar a força, perseverança e paciência quando o caminho parecia difícil. Obrigado, por mais essa realização em minha vida.

Aos **meus pais**, Márcia e Diércules pela paciência, apoio, amor e carinho, em todos momentos. Porque, concerteza essa vitória não é só minha, é nossa. Amo Vocês.

A **Ronaldo** e a **Janete**, que sempre torceram por mim.

A minha tia **Rosângela**, que mesmo longe sempre sonhou e acreditou comigo na minha vitória.

Aos **meus amigos**, agora, biólogos, que estiveram comigo durante esses cinco anos de muitas lutas e conquistas.

Aos **meus amigos**, em especial, Joanda, Kilmara, Gil, Angélica, Aminthas, Geruíza, Maedy, Vanessa e Léo que sempre acreditaram em mim e que me deram forças sempre que precisei.

À alguém **especial** chamado Eduardo, que sempre me apoiou e me deu colo e muitos beijos quando eu esquecia de acreditar. Te amo.

A minha Orientadora **MS.c Rosália Severo de Medeiros**, pela dedicação, humildade, amizade em todos momentos me ajudando a tornar possível este trabalho.

Aos professores **Dr. Onaldo Guedes Rodrigues** e **Dr. Vicente Queiroga Neto**, pelos bons conselhos, para um bom desempenho profissional.

Ao professor **Dr. Éder Ferreira Arriel**, pelo apoio, ensinamentos e amizade que contribuíram para minha formação.

Ao professor **Felicio Garino Júnior**, ao **Rodrigo** e **Ramon** pela paciência, suporte e auxílio em tudo.

Ao Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário, por fazer possível a realização desse trabalho.

Ao **CNPq** pela oportunidade como bolsista PIBIC.

A Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, por esses cinco anos de graduação que valeram á pena.

Aos professores da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, que me fizeram chegar onde estou hoje.

A todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

LISTA DE TABELA

Página

- Tabela 1.** Efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de óleo essencial da *Mentha piperita* L. sobre os halos de crescimento da *Listeria monocytogenes.*, *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteridis* após 24 horas. 27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Mentha piperita</i> L .	08
Figura 2. Padronização dos inóculos na escala McFarland.....	21
Figura 3. Distribuição das concentrações em tubos de ensaio.....	21
Figura 4. Semeadura das cepas bacterianas por estriamento.....	22
Figura 5. A: identificação das diluições nas placas de Petri, B e C: confecção das cavidades com bastão de vidro, D: inoculação das bactérias + o óleo com o meio (CMH) nas cavidades.....	23
Figura 6. A, B, C, D: efeito antibacteriano após 24 horas, amostras semeadas por estriamento em suas respectivas concentrações, comparadas ao controle positivo.....	26
Figura 7. Medição dos halos de crescimento em suas concentrações após 24 horas	26
Figura 8. Comportamento do halo de crescimento das cepas bactérias sob ação do óleo da <i>Mentha piperita</i> L. após 24 horas.....	28

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Importância do uso das plantas medicinais com atividade antimicrobiana.....	03
2.2 Óleos essenciais.....	04
2.3 Função dos óleos essenciais para as plantas.....	05
2.4 <i>Mentha piperita</i> L.	06
2.5 Métodos de extração.....	08
2.6 Bactérias patogênicas.....	13
2.6.1 Bactérias gram-positivas.....	13
2.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.6.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.7 Bactérias gram-negativas.....	16
2.7.1 <i>Escherichia coli</i>	16
2.7.1 <i>Salmonella enteridis</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Óleo essencial.....	20
3.2. Microrganismos.....	20
3.3. Meios de cultura.....	20
3.4. Preparo e padronização das diferentes concentrações.....	20
3.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....	22
3.4.2 Curva de redução da atividade do óleo.....	23
3.5 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Análise da atividade antibacteriana.....	25
4.2 Análise estatística dos dados.....	26
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS	30

SANTOS, Camila Carneiro Monteiro dos. **Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*.** 2011. Monografia (Graduação em Licenciatura de Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos - PB, 2011.

RESUMO

A *Mentha piperita* L., mais conhecida como hortelã-pimenta é uma planta nativa da região do Mediterrâneo, mas é muito abundante aqui no Brasil. A hortelã-pimenta possui cheiro forte, bastante aromático de sabor característico e especial, picante, que deixa na boca sensação de frescor agradável. Seu óleo essencial rico em mentol possui propriedades antibacterianas, espasmolíticas eliminando gases intestinais e possíveis sensações de mal estar. Sendo um óleo essencial muito utilizado pela sua ação terapêutica, neste trabalho, buscamos avaliar sua atividade antimicrobiana “in vitro” sobre quatro cepas de bactérias patogênicas sendo, *Salmonella enteridis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, através do método de difusão em agar e microdiluição para determinação concentração inibitória mínima (CIM) nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6 e 0,3%. Os resultados apresentaram efeito inibitório significativos para quatro cepas de bactérias. Portanto, concluímos que, o óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresenta potencial antibacteriano sobre as cepas testadas.

Palavras-chave: hortelã- pimenta, óleo essencial, antibacteriana

SANTOS, Camila Monteiro dos. **Antibacterial activity of essential oil of *Mentha piperita* L. on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus***. 2011. Monography (Graduation in of Biological Sciences) - Federal University of Campina Grande, Centro de Saúde e Teconologia Rural, Patos - PB, 2011.

ABSTRACT

The *Mentha piperita* L., commonly known as peppermint is a plant native to the Mediterranean, but is very abundant in Brazil. The peppermint has strong smell, very aromatic and special flavor, spicy, which leaves the mouth feeling fresh pleasant. It's essential oil rich in menthol has antibacterial, spasmolytic eliminating intestinal gas and possible feelings of malaise. As an essential oil widely used for its therapeutic action, in this work, we seek to evaluate their antimicrobial activity "in vitro" on four strains of pathogenic bacteria and, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, by agar diffusion method and a microdilution for to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) at concentrations of 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6 and 0.3%. The results showed significant inhibitory effect for four strains of bacteria. So, we conclude that the essential oil of *Mentha piperita* L. has antibacterial potential of the strains tested.

Keywords: peppermint, essential oil, antibacterial

1 INTRODUÇÃO

Partindo do ponto de que várias espécies de bactérias estão se tornando resistentes aos muitos antimicrobianos surge, a partir daí, um desafio no tratamento de infecções, tornando-se necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos. As propriedades de algumas substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidas em nosso uso cotidiano durante muito tempo.

As substâncias químicas dos óleos essenciais apresentam compostos capazes de inibir direta ou indiretamente os sistemas enzimáticos bacterianos. Seu comportamento é semelhante aos antibióticos, que são definidos como “substâncias químicas com capacidade para matar ou inibir o desenvolvimento de bactérias ou outros microrganismos.” (KURYLOWICZ, 1981 *apud* ERNANDES e CRUZ, 2007).

Com a difusão das modernas técnicas de preservação houve interesse acentuado e renovado sobre algumas especiarias utilizadas principalmente como condimentos alimentares, pois, além de participarem como ingredientes de inúmeros alimentos, tornando-os mais saborosos e digestivos, apresentam ação indireta e complementar como agentes antimicrobianos, devido à presença de óleos essenciais. Esses óleos essenciais são constituídos por princípios voláteis que podem ser obtidos mediante à um processo de extração (WIEST, 1999 *apud* ERNANDES e CRUZ, 2007).

Embora seja planta nativa da região do Mediterrâneo, *Mentha piperita* L. – *Lamiaceae*, a hortelã- pimenta é cultivada em todos os lugares do mundo e utilizada na culinária, nas indústrias de alimentos e perfumes, na agricultura e na medicina. O óleo essencial é um dos mais produzidos e consumidos (ISCAN *et al.*, 2002), composto por mentofurano, mentol, acetato de metila, mentona, 1,8 cineol, pulegona, α -limoneno, β -pineno, isomentol, α - pineo e mirceno (DAVID *et al.*, 2006).

Uma das maiores importância das bactérias seria o fato delas como agentes patogênicos do homem provocando a maioria das muitas infecções que o acometem, geralmente podendo ser provocadas pelo ao fato desses microrganismos produzirem toxinas, que são nocivas para as células humanas.

Se estas estiverem presentes em número suficiente e a pessoa a ser infectada não dispuser de uma imunização contra elas, o resultado é a doença. Um exemplo é a

Escherichia coli que é um importante componente da nossa microbiota intestinal, no entanto, fora do intestino pode causar importantes e graves infecções, principalmente nas vias urinárias.

O *Staphylococcus aureus*, representam grande problema junto a saúde pública devido a produção de enterotoxina, reconhecida como principal efeito implicado em casos de toxinfecções alimentares.

A listeriose resulta, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* (MEAD *et al.*, 1999 *apud* BARANCELLI *et al.*, 2011) geralmente processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos e consumidos sem aquecimento (MCLAUHLIN, 1996 *apud* BARANCELLI *et al.*, 2011), tal como ocorre com os produtos de laticínios, principalmente queijos.

Os seres humanos contraem a infecção por *Salmonella enteridis* ingerindo produtos contaminados de origem animal. Os alimentos mais associados a surtos de *Salmonella enteridis* são aves e ovos e estes podem ser contaminados durante a passagem pela cloaca da galinha ou por infecção transovariana. O risco não está associado a ovos sujos: ovos aparentemente limpos podem transmitir a infecção pela *Salmonella* se ingeridos crus ou mal cozidos. A *Salmonella enteridis* também está associada à carne de aves, principalmente quando cozida e resfriada e ingerida fria, ou depois de ser reaquecida (CAETANO *et al.*, 2004).

Bactérias patogênicas como estas citadas, invadem nosso organismo e agem diretamente em nosso intestino, necessitando de cuidados e medicamentos em dosagens certas. O mau uso de antibióticos ocasionando resistências de muitas espécies de bactérias conhecidas vem se tornando um fantasma no dia-a-dia de médicos, pesquisadores e farmacêuticos. Como resposta a essa resistência estão tentando explorar ainda mais nossa flora onde existem muitas plantas medicinais conhecidas pelos seus princípios e ações benéficas a nossa saúde. Como exemplo, temos a hortelã, que é usada não só na culinária, possuindo propriedades antibacterianas e seu óleo essencial é muito utilizado principalmente contra problemas gastrointestinais.

Plantas medicinais ou especiarias como o hortelã assumem relevante importância para serem avaliados como potenciais agentes inibitórios de microrganismos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antibacteriano “*in vitro*” do óleo essencial da *Mentha piperita* L. sob quatro espécies de bactérias patogênicas, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis* e *Staphylococcus aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância do uso das plantas medicinais com atividade antimicrobiana

De forma crescente, tem-se acumulado evidências de intervenções humanas, com sua capacidade de gerar modificações complexas no ambiente circundante, associadas ao potencial de mudanças na estrutura genética das bactérias. De forma sinérgica têm-se atuado, no sentido de gerar variantes bacterianas de maior patogenicidade ou dotadas de resistência aos recursos tecnológicos disponíveis para combatê-las (BARRETO, 2008).

No decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (SILVEIRA *et al.*, 2006).

A resistência microbiana pode ocorrer naturalmente, fruto direto de mutação, ou pode ser adquirida através de fenômenos de recombinação gênica entre bactérias. A resistência é vinculada à transferência de plasmídeos, ou através de pequenos segmentos de DNA denominados transposons, capazes de transpor o DNA, de uma região à outra. (TORTORA *et al.*, 2005 *apud* DANTAS *et al.*, 2010). A resistência, portanto, é sempre resultante de uma alteração no genótipo do organismo (MANTILLA *et al.*, 2008 *apud* DANTAS *et al.*, 2010).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre vários microrganismos patogênicos, estudos buscam por um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos (ALVARENGA *et al.*, 2007). A atividade antimicrobiana desejada pode ser encontrada em espécies de plantas medicinais. A flora brasileira apresenta-se altamente diversificada em espécies que na sua maioria ainda não foi

pesquisada cientificamente quanto à sua ação antimicrobiana (ALVARENGA *et al.*, 2007).

Em muitas sociedades as plantas medicinais constituem a base nos cuidados à saúde. A recuperação desse conhecimento e práticas associadas a esses recursos vegetais fazem parte de uma importante estratégia ligada à conservação da biodiversidade, a descoberta de novos medicamentos (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Atualmente, grande parte da população brasileira encontra nas plantas medicinais importantes fontes de recurso terapêutico. Isso se deve a vários fatores, dentre os quais é possível destacar a crise econômica e o alto custo de medicamentos industrializados, bem como, o difícil acesso da população à assistência médica. Aliada a essa situação verifica-se crescente tendência dos consumidores de utilizar “produtos naturais” e ainda o fato de muitas pessoas se renderem à facilidade de obtenção de plantas medicinais, as quais muitas vezes são cultivadas nos quintais de suas casas (BALDAUF *et al.*, 2009 *apud* SPEROTTO 2010).

Conforme Mota (2008) *apud* Sperotto (2010) atualmente apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem animal, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna. Destaca também que produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas.

2.2 Óleos essenciais

A diversidade da vegetação brasileira, resultado das adaptações dos organismos às amplas variações nas condições edafoclimáticas do país, representa uma reserva potencial de novos fitoquímicos bioativos. Dentre as partes vegetais mais pesquisadas na busca de atividades biológicas, destacam-se os óleos essenciais, são também denominados “óleos voláteis”, compostos oleosos aromáticos, de composição complexa contendo dentre outros componentes, hidrocarbonetos terpênicos, ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e fenóis, em concentrações variáveis em dependência de diversos fatores, sendo que a composição majoritária é representada por um composto farmacologicamente ativo (BURT, 2007 *apud* DANTAS *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais extraídos a partir de várias espécies medicinais nativas têm demonstrado eficiente atividade antimicrobiana frente à patógenos de interesse médico-

sanitário (DANTAS *et al.*, 2010). Dentre estes destacamos a *Mentha piperita L.* que é uma planta aromática da família *Lamiaceae*, conhecida também como hortelã-pimenta ou hortelã da folha miúda (VALMORBIDA *et al.*, 2006). Seu óleo é empregado como flavorizante aditivo em alimentos, em produtos de higiene bucal e preparações farmacêuticas, no tratamento de problemas respiratórios e gastrointestinais, apresentando ações antimicrobianas e espasmolítica, facilitando a digestão e é responsável pela eliminação de gases do aparelho digestivo (VALMORBIDA, *et al.* 2006).

A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (BERNETI *et al.*, 2005 *apud* SILVA *et al.*, 2009). Óleos essenciais apresentam ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DORMAN & DEANS, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2007; USHIMARU *et al.*, 2007 citado por SILVA *et al.*, 2009).

2.3 Função dos óleos essenciais para as plantas

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas e são utilizados para proteção e atração de polinizadores. Quimicamente são derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides. Os terpenóides são os constituintes preponderantes nos óleos essenciais, sendo os mais frequentes os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos. Grandes variações nas composições dos óleos essenciais têm sido observadas, dependendo da origem da planta, do estágio de desenvolvimento e da parte usada para a destilação do óleo (SIMÕES *et al.*, 2002 *apud* NOGUEIRA *et al.*, 2007)

Entre o primeiro grupo estão o limoneno e o mentol, os quais possuem cheiro agradável também para nós. Um exemplo clássico do segundo grupo são os piretróides. Esses compostos são inseticidas naturais derivado do cravo-de-defunto (*Chrysanthemum* spp). A volatilidade desse inseticida tem sido bastante útil para o desenvolvimento dos conhecidos inseticidas domésticos para repelir pernilongos.

Os diterpenos normalmente estão associados às resinas de muitas plantas. Um exemplo é a resina cicatrizante de *Hymenaea courbaril*. Contudo, talvez o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas, as quais são importantes hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais. Entre os triterpenos está uma

importante classe de substâncias tanto para vegetais quanto para animais. Trata-se dos esteróides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdiesteróides).

Uma outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, as saponinas são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais. Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte solúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos. Isso pode ocorrer de diversos modos. Uma delas é a complexação das saponinas com esteróides dos fungos, tornando-os indisponíveis (PERES, 2004).

A presença de vários princípios ativos nos extratos vegetais é explicada pelo fato das plantas normalmente desenvolvem uma série de metabólitos com funções complementares na defesa contra pragas e doenças. Essa estratégia impede o desenvolvimento de resistência por parte dos organismos maléficos. Muitos desses compostos, apesar de serem suficientes para matar insetos ou mesmo vertebrados de grande porte, quando utilizados em doses adequadas convertem-se em medicamentos. Desse modo, produtos secundários envolvidos na defesa através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antimicrobianos na medicina (BRISKIN, 2000 *apud* PERES, 2004).

2.4 *Mentha piperita* L.

A hortelã-pimenta do latim *Mentha piperita* L., vem do grego *Mintha*. É uma das mais antigas dentre as ervas medicinais do mundo, e é usada em tradições tanto orientais quanto ocidentais.

Seu nome botânico *Mentha* deriva de *Mintha*, nome dado à ninfa que a deusa grega Perséfone, por ciúmes, transformou em planta e *piperita* = pimenta, relacionado ao sabor apimentado desta espécie. A Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil 1ª Edição (1926) descreve as folhas e sumidades floridas que constituem a droga vegetal: A hortelã pimenta é uma planta herbácea de caule quadrangular, ramoso, de 1 a 2 mm de diâmetro, com folhas pecioladas, ovais-oblongas ou oblongo-lanceoladas, acuminadas, desigualmente serradas, de 5 a 9 cm de comprimento, de cor verde clara a pardo-purpurina, quase glabras na página superior e pubescentes na inferior,

principalmente sobre as nervuras; os pecíolos são levemente pubescentes e medem de 5 a 15 mm de comprimento(Figura 1).

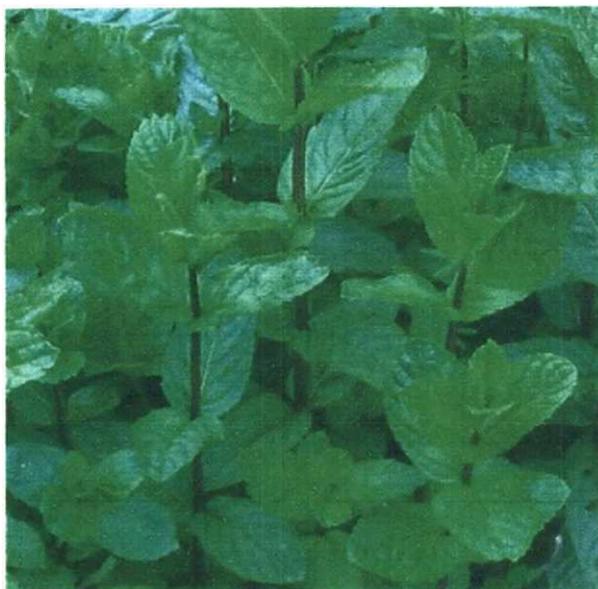
A inflorescência é composta de espigas terminais formadas de glomérulos axilares; as brácteas são oblongo-lanceoladas, nimbamente pontilhadas de glândulas e em geral de cor purpurina escura; a corola é de cor purpurino-arroxeadada clara, tubular-campanulada, de cerca de 3 mm de comprimento, subregular, com quatro lobos, e glabra interna e externamente; os estames, em número de quatro, são quase iguais e inclusos. A hortelã-pimenta possui cheiro forte, bastante aromático, característico e sabor especial, picante, aromático, que deixa na boca sensação de frescura agradável.

Culturas gregas, romanas e egípcias, já usavam a erva na culinária e na medicina. A hortelã-pimenta contém aproximadamente de 1,2-1,5% óleo essencial. Seu óleo essencial é volátil, também conhecido como *menthae aetheroleum piperitae*, contém 30-70% de mentol e mentol ésteres e mais outros 40 compostos. Farmaceuticamente é um óleo comestível, produzido pela destilação das partes aéreas frescas da planta no início do ciclo de floração, e padronizado para conter pelo menos 44% mentol, Mentona 15-30% e 5% de ésteres, além de vários terpenóides e outros compostos (GARDINER, 2000).

Imei (2001) e Matos (1998) *apud* Alves (2011) relataram uma expressiva atividade do óleo essencial da *Mentha piperita L.*, descrevendo tal espécie produtora de óleo essencial rico em mentol, mentona e mentofurano, sendo estes compostos mais abundantes nas folhas.

O mentol é o principal componente do óleo essencial da hortelã-pimenta, ocorrendo naturalmente como um cristal incolor ou pó. O mentol é o maior responsável pela natureza espasmolítica da hortelã-pimenta. Ela estimula o fluxo biliar, e tem propriedades antibacterianas (GARDINER 2000).

Figura 1 – *Mentha piperita* L.



Fonte: <http://www.essentialoilindia.com>

2.5 Métodos de Extração

Os óleos essenciais provêm de diferentes partes das plantas: pétalas, raízes, caule, bagas, sementes, seiva, folhas ou casca. Dependendo do tipo de planta em questão os óleos concentram-se num local distinto. Da mesma forma, o método de extração ideal também varia em função da planta. As características químicas de um óleo essencial poderão ser diferentes conforme o método empregado para a extração do mesmo. O calor e a pressão usados no ato da extração podem, por exemplo, interferir na qualidade final do óleo essencial, pois no momento da extração as sensíveis moléculas de um precioso princípio ativo podem ser quebradas e oxidadas em produtos de menor eficácia, ou às vezes até tóxico.

São vários os métodos de extração existentes, dentre eles destacamos alguns a seguir:

- Destilação a Vapor

A destilação a vapor é o mais comum método de extração de óleos essenciais. Normalmente é empregado para obterem-se óleos essenciais de folhas e ervas, mas nem

sempre é indicado para extrair-se o óleo essencial de sementes, raízes, madeiras e algumas flores. Por exemplo, flores como o Jasmim, podem sofrer destruição de suas frágeis moléculas aromáticas, vindo a perder todo o seu perfume e princípios ativos, devido à alta pressão e calor empregado no processo. A destilação a vapor é feita em um alambique onde partes frescas da planta e algumas vezes secas são colocadas dentro. Saindo de uma caldeira, o vapor circula através das partes da planta forçando a quebra das frágeis bolsas intercelulares que se abrem e liberam o óleo essencial. À medida que este processo acontece, as sensíveis moléculas de óleos essenciais evaporam junto com o vapor da água viajando através de um tubo no alto do destilador, onde logo em seguida passam por um processo de resfriamento através do uso de uma serpentina e se condensam junto com a água. Forma-se então, na parte superior desta mesma água obtida, uma camada de óleo essencial que é separado através de decantação. A água que sobra de todo este processo, depois de retirado o óleo, é chamada de água floral, destilado, hidrosol ou hidrolato.

- Extração por Solvente

Determinados tipos de óleos são muito instáveis e não suportam o aumento de temperatura. Por isto, é usada a extração por solvente para se conseguir o óleo essencial destas plantas. Neste processo um solvente químico como o hexano é usado para extrair os compostos aromáticos da planta. Isto fornece um produto chamado de concreto. O concreto pode ser dissolvido em álcool de cereais para remover o solvente. Quando o álcool evapora, o absoluto aparece.

No processo de extração do concreto obtém-se não somente o óleo essencial, mas também ceras, parafinas, gorduras e pigmentos. Neste caso, o concreto acaba tendo uma constituição pastosa (o concreto do Jasmim real possui em torno de 55% de óleo essencial). Já o absoluto, além de fazer uma limpeza dos solventes anteriormente empregados, também purifica a mistura das ceras, parafinas e substâncias gordurosas presentes, o que leva o produto final a ter uma consistência mais líquida. O teor de solvente no produto final pode variar de menos de 1% até 6%. Em teores tão baixos quanto 1% consideramos o produto apto ao uso terapêutico, isso quando indicado neste sentido, e no caso daqueles obtidos somente pelo uso do álcool, é aceitável seu emprego com esta finalidade mesmo em teores superiores a 1%, como acontece com algumas resinas como a mirra e benjoim (é como comparar com o uso de tinturas de plantas, mas

com teor quase imperceptível de álcool). A extração por solvente também pode alterar em muito a composição química do produto final.

- Por CO₂ hiper-crítico

As partes das plantas a serem extraídas são colocadas em um tanque onde é injetado dióxido de carbono hiper-crítico a uma pressão de 200 atmosferas e temperaturas superiores de 31°C. Nessa pressão e temperatura, o CO₂ atinge o que seria um quarto estado físico, no qual a sua viscosidade é semelhante à de um gás, mas a sua capacidade de solubilidade é elevada como se fosse um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se com que a pressão diminua e o gás carbônico volta ao estado gasoso, não deixando qualquer resíduo de solvente. A grande solubilidade e a eficiência na separação tornam o CO₂ hiper-crítico mais indicado para ser utilizado na indústria do que solventes orgânicos. Por CO₂ hiper-crítico podem ser retirados os terpenos presentes nos óleos essenciais, tornando assim um óleo essencial mais puro.

- Prensagem a frio

Outro método de extração de óleos essenciais é por prensagem a frio (pressão hidráulica) ou esscarificação. Ele é usado para obter óleo essencial de frutos cítricos como bergamota, laranja, limão e grapefruit. Neste processo, as frutas são colocadas inteiras e prensadas por uma prensa hidráulica e delas extraído tanto o óleo essencial quanto o suco.

Após a prensagem, é feita a centrifugação da mistura, através da qual se separa o óleo essencial puro. Existe também a extração de óleos de cítricos por destilação a vapor, o que é feito para eliminar as furanocumarinas que mancham a pele. Porém é considerado o óleo retirado por prensagem a frio de qualidade superior no sentido terapêutico. Não somente é feita extração de óleos essenciais de cítricos por este método, mas de maneira semelhante o óleo extra-virgem de amêndoas, castanhas, nozes, germe de trigo, oliva, semente de uva e também de algumas sementes das quais se extrai normalmente o óleo essencial por destilação, como é o caso do cominho negro.

Em casa pode simular este método, bastando para tal descascar os frutos e reservar a parte externa da casca, local onde se acumulam as essências. Posteriormente,

corte as cascas em pedaços e coloque-as num pano de linho ou algodão. Depois, sobre uma tábua, triture-as tanto quanto possível. Por último, colha o líquido que escorre no pano para um pequeno frasco, que deve ser hermeticamente conservado e prontamente fechado para evitar a evaporação dos óleos essenciais.

- Turbodestilação

Vários métodos de extração modernizados têm-se tornado alternativas para a destilação a vapor. A turbodestilação é adequada para partes de difícil extração de óleo essencial da planta, como é o caso de cascas, raízes e sementes. Neste processo as plantas são emersas na água e o vapor é posto a circular então em meio a esta mistura de planta e água.

Através deste processo, a mesma água é continuamente reciclada através do material da planta. Este método torna mais rápido a extração de óleos essenciais de difícil e lenta obtenção. Na hidrodifusão, o vapor sob pressão atmosférica normal é disperso do topo da câmara diretamente sobre o material da planta. Desta forma o vapor pode saturar o material mais igualmente e em menor tempo do que na destilação a vapor. Este método é também menos severo do que a destilação a vapor, resultando em óleos essenciais que cheiram de forma muito mais semelhante às plantas originais e melhores.

- Hidrodestilação

Na hidrodestilação a matéria-prima vegetal é completamente mergulhada em água, sem que a temperatura ultrapasse os 100° C. Neste processo, evita-se a perda de compostos sensíveis a altas temperaturas, mas, em compensação, torna a destilação mais lenta e com menor rendimento. Trata-se de uma técnica de destilação bastante antiga (artesanal), mas que continua sendo praticada em países atrasados cujas caldeiras a vapor ainda não chegaram.

- Enfleurage

Algumas flores como o Jasmim ou Tuberosa têm baixo teor de óleos essenciais e são extremamente delicadas não podendo ser destiladas a vapor, pois podem sofrer

perdas quase completas de seus compostos aromáticos. Em alguns casos um processo lento e caro chamado enfleurage é utilizado para obter-se o óleo essencial destas flores. As pétalas, então, são colocadas em gordura vegetal ou animal, sem cheiro, para que absorve os óleos essenciais.

Todos os dias ou de determinadas a determinadas horas, depois que a gordura absorveu todo o óleo essencial possível, as pétalas são removidas e substituídas por outras frescas, recém-colhidas. Este procedimento continua até que a gordura venha a ficar saturada com o óleo essencial. Adicionando álcool à mistura é possível separar o óleo essencial da gordura, pois o óleo essencial é mais solúvel no álcool. Aí então teremos o absoluto. Este é um processo difícil e demorado. Normalmente o enfleurage puro, somente é empregado em fazendas de interior na Europa.

- Fitós ou Florasóis

Este método de extração utiliza um novo tipo de solvente gasoso que não é tóxico e não deixa resíduo. Nos fins da década de 80, o Dr. Peter Wilde pela primeira vez analisou as propriedades específicas deste solvente, o "florasol" (R134a), para a extração de óleos aromáticos e compostos ativos de materiais de plantas, tanto para uso dentro da alimentação, farmácia, aromaterapia e indústria de perfumes.

A extração ocorre sob temperatura ambiente e, devido a isso, não há degradação química dos produtos. O óleo essencial obtido por este processo é limpo, claro e completamente livre de gorduras e ceras. O Dr. Wilde patenteou sua descoberta como "fitol", ou "fitônicos".

- Maceração

Para extrair as suas próprias essências em casa utilizando este método, é necessário macerar num óleo as suas flores preferidas (jasmim, rosas, etc.) até que este fique totalmente impregnado com o aroma das flores e escolher um óleo carreador. Uma forma muito simples de fazer consiste em colocar num recipiente de cobre uma parte de pétalas de flores e duas partes de um óleo (óleo de amêndoa ou girassol). Posteriormente, aquece esta infusão, lentamente, durante 3 horas. No final, filtram-se as flores, espremendo-as energicamente e reserva-se a solução resultante num local fresco, afastada do sol. (Fonte: <http://www.oleosessenciaisnaturais.blogspot.com>)

2.6 Bactérias patogênicas

As bactérias patogênicas podem produzir doenças tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação nos tecidos quanto pela produção de toxinas (VIERA *et al.*, 2008). Bactérias patogênicas como a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, destacam-se como contaminantes comuns na indústria de alimentos, sendo relevantes do ponto de vista médico-sanitário. Tais espécies apresentam cepas resistentes aos antibióticos usuais, tornando a sua presença em alimentos e superfícies de trabalho uma ameaça potencial à saúde coletiva.

Sabe-se que a *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal dos animais, inclusive do homem, e que os ambientes humanos e animais não são separados, razão pela qual as bactérias de origem animal podem passar para seres humanos. Além disso, os determinantes de resistência às drogas de diferentes fontes podem ser transferidos entre as bactérias (MOREIRA *et al.*, 2008 *apud* SPEROTTO, 2010).

Diante do aumento de casos de infecções de natureza bacteriana resistente, bem como a dificuldade no controle de seus agentes etiológicos em instalações da indústria alimentícia e em estabelecimentos comerciais, o uso de bioativos oriundos da flora nativa tem sido apontado como uma possível solução para o problema. Desse modo, esforços têm sido realizados visando à prospecção, o isolamento e a caracterização de princípios ativos úteis ao desenvolvimento de novos antimicrobianos. (DANTAS *et al.*, 2010).

2.6.1 Bactérias Gram-positivas

2.6.2 *Staphylococcus aureus*

Morfologicamente apresentam-se como células esféricas medindo de 0,5-1,5 μm de diâmetro apresentando-se em arranjos individuais (forma de cacho), aos pares e agrupamentos irregulares. São bactérias Gram positivas; imóveis; não esporulados; aeróbios ou anaeróbios facultativos; quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. As colônias são geralmente opacas, podendo ser branco, creme, amarela ou laranja (GOMES, 2010).

O diagnóstico das infecções causadas pelo *S.aureus* é feito pelo exame bacterioscópico de esfregaços corados pelo Gram, isolamento e identificação do microrganismo. O isolamento é realizado nos meios de cultura comuns, como Agar sangue onde a bactéria forma colônias relativamente grandes. Há também, vários meios seletivo-indicadores, entre os quais se inclui o ágar manitol-salgado, podem também ser empregados para essa finalidade (TEXEIRA *et.al*, 2008)

O *Staphylococcus aureus* pode ser encontrado em várias partes do corpo, como fossas nasais, garganta, trato intestinal e pele. As infecções estafilocócicas podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo (infecções endógenas), por amostras adquiridas de outros doentes ou de portadores sadios (infecções exógenas). A transmissão ocorre por contato direto ou indireto (TEXEIRA *et.al*, 2008)

Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, o *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de diversas infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade (TEIXEIRA *et. al*, 2008). Em algumas dessas infecções, predomina-se um quadro infeccioso caracterizado à presença do microrganismo, enquanto em outros as manifestações são basicamente de uma intoxicação, podendo estar presente no organismo ou não.

Apesar da grande variedade de quadros clínicos causados pelo *S. aureus*, estes podem ser divididos em, três principais tipos: as infecções superficiais, tais como os abscessos cutâneos e as infecções de feridas; as infecções sistêmicas, tais como, endocardite, ostiomielite e pneumonia, e os quadros tóxicos tais como síndrome do choque tóxico e a intoxicação alimentar.

O diagnóstico da intoxicação alimentar é realizado pela pesquisa das enterotoxinas nos alimentos ingeridos, de modo geral o *S.aureus* pode ser encontrado em grande quantidade no alimento que contém a enterotoxina responsável pelas manifestações clínicas. Sua importância clínica tem variado ao longo dos anos, tendo crescido particularmente devido ao aumento da ocorrência dessas infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes (TEIXEIRA *et. al*, 2008).

O *S. aureus* e outras espécies coagulase positivas, tais como o *S. intermedius* produzem grande quantidade de proteínas extracelulares associadas às células do hospedeiro. Essas proteínas são importantes na colonização e crescimento dos estafilos em vários tecidos. A presença desses organismos sobre a superfície, assim como de seus

produtos extracelulares, demonstra como esses patógenos estabelecem as infecções. Muitas toxinas citolíticas, freqüentemente chamadas de hemolisinas; enzimas tais como proteases, lipases, hialuronidase agem associadas para criar lesão tecidual, fornecendo nutrientes de baixo peso molecular que podem ser assimilados e utilizados para o seu rápido crescimento.

A doença resulta de um fenômeno complexo entre as várias proteínas de superfície envolvidas na colonização celular, enzimas, toxinas e ambiente extracelular (GOMES, 2010).

2.6.3 *Listeria monocytogenes*

Bastonetes regulares ou pequenos medindo 0,4-0,5 X 0,5-2,0 μm com extremidades arredondadas. Algumas vezes, são cocóides ocorrendo em arranjos simples ou em pequenas cadeias e, menos freqüentemente, em longos filamentos.

São células Gram positivas, não esporuladas, não AAR (Álcool-Ácido Resistente) e não capsuladas. Elas são móveis apresentando flagelos peritríquios quando crescidas a temperatura de 20- 25°C, sendo, facultativamente anaeróbias (LABACVET, 2007).

A *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, sobrevivendo e proliferando em macrófagos, enterócitos e outras células. Além de ser um importante patógeno oportunista humano, causador de diversas infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, mulheres grávidas e recém-natos, a *L.monocytogenes* causa a listeriose que é adquirida após a ingestão de alimentos contaminados e manifesta-se como gastroenterite, meningite, encefalite, infecção materno-fetal, bacteremia, endocardites, infecções localizadas, abscessos cerebrais e septicemia, resultando em uma taxa de mortalidade que ultrapassa 20% (CAMPOS, 2008 e SILVA, 2008).

Segundo Campos e Silva (2008), a listeriose é relativamente rara em crianças e adultos imunocompetentes e está relacionada principalmente ao estudo do sistema imune do indivíduo. Dados epidemiológicos de diferentes países comprovam essa assertiva, colocando como evidência o alimento contaminado como fonte de transmissão e, conseqüentemente, classificando a listeriose entre as infecções de origem alimentar.

Esses microrganismos toleram altas concentrações de sal e pHs relativamente baixos, além disso, são capazes de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração.

Embora seja um microrganismo ubiqüitário, bem adaptado ao ambiente, capaz de ser isolado em diversas fontes ambientais, como água, solo, produtos alimentares, animais e humanos, ele possui um arsenal de genes que facilitam sua sobrevivência intracelular, uma vez que é capaz de invadir e sobreviver dentro da célula do hospedeiro, escapando, assim, do sistema imune. Desse modo, conseguem sobreviver às tecnologias de processamento de alimentos. Isto torna a *Listeria* um dos microrganismos que mais preocupam a indústria alimentícia (CAMPOS, 2008 e SILVA, 2008).

2.7 Bactérias Gram-negativas

2.7.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* e outras espécies da família *Enterobacteriaceae* são facultativamente anaeróbicos, bastonetes Gram negativos que podem ser móveis ou imóveis. Também são produtoras de catalase. O trato gastrintestinal da maioria dos animais de sangue quente é colonizado pela *E. coli* em poucas horas ou em poucos dias após o nascimento. O microrganismo é ingerido junto com o alimento, água ou obtido diretamente de outros indivíduos. É encontrado no trato gastrointestinal do homem. (GOMES, 2011)

A diversidade patogênica da *E. coli* chega a ser fantástica. A espécie compreende pelo menos cinco categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, meningites e provavelmente outras infecções extra-intestinais. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente chamadas de *E. coli* diarreio gênica e as associadas a infecções extra-intestinais de EXPEC (*Extraintestinal Pathogenic E.coli*) (GOMES e TRABULSI, 2008).

A primeira categoria de *E. coli* diarreio gênica identificada foi a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). As EPEC típicas têm como reservatório somente o homem, raramente são encontradas em animais. Uma proporção elevada de crianças adquire infecção em hospitais públicos, geralmente a partir de uma criança internada com diarreia. As vias de transmissão não têm sido caracterizadas com precisão, mas devem incluir contato pessoal e ingestão de água e alimentos contaminados (GOMES e TRABULSI, 2008).

A *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga (STEC) esta categoria foi caracterizada pela produção de potentes citoxinas que apresentam a capacidade de inibir

a síntese protéica de células eucarióticas. Os bovinos representam o principal reservatório natural das STEC e a carne bovina, em especial a carne moída, o leite e seus derivados, os vegetais e água contaminados por material fecal ingeridos crus ou com cozimento insuficiente são as formas mais comuns de transmissão da bactéria para o homem (GUTH, 2008).

Entre as categorias encontra-se a *E.coli* enteroagregativa (EAEC), cuja característica principal é a capacidade de se apresentar um padrão de adesão exclusivo em determinadas linhagens celulares cultivadas “in vitro”. Este padrão adesão agregativa (AA) permite que a EAEC se diferencie das duas outras categorias. Adultos e crianças são suscetíveis a infecções intestinais causadas por EAEC, e a doença típica é manifestada por diarreia secretadora. Em modelos animais e pacientes infectados, EAEC parece ser capaz de colonizar várias regiões do trato intestinal sem danos aparentes na mucosa do intestino delgado, onde há abundante adesão ao muco e secreção de muco, mas com efeitos citotóxicos na mucosa do cólon (JÚNIOR e GOMES, 2008).

As bactérias ficam emaranhadas em espessa camada de biofilme contendo muco em abundância. Possivelmente, a formação desse biofilme esteja envolvida na capacidade de a bactéria colonizar e causar doença persistente e má absorção de nutrientes (JÚNIOR e GOMES, 2008).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), esta categoria, se define pela capacidade em produzir as enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). O mecanismo das ETEC compreende basicamente a colonização da mucosa intestinal e a produção de enterotoxinas. A colonização está relacionada à capacidade desta bactéria em aderir a receptores específicos presentes na superfície do epitélio intestinal através de estruturas que foram denominadas genericamente de fatores de colonização (CFs). A importância da capacidade de colonização não está restrita apenas ao estabelecimento da região de infecção, como também facilita a interação enterotoxina-receptor, evitando a degradação da toxina por enzimas proteolíticas (GUTH, 2008).

As infecções são transmitidas principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados, contudo a transmissão por contato pessoal em berçários e enfermarias pediátricas também tem sido relatada. A infecção por ETEC pode resultar em um amplo espectro de sintomas, desde uma diarreia branda até uma diarreia mais grave acompanhada de desidratação, podendo em casos extremos levar ao choque. Entretanto, a infecção é autolimitada, tendo duração média de um a dois dias (GUTH, 2008).

E. coli enteroinvasora (EIEC) é um importante causador de diarreia no homem. EIEC interage preferencialmente com a mucosa do cólon, e esse é seu sítio de interação parasita-hospedeiro. Clinicamente a doença é acompanhada de febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarreia aquosa seguida de disenteria consistindo poucas fezes, muco e sangue. Amostras de EIEC crescem bem em meios não-seletivos. As infecções intestinais provocadas por EIEC são mais frequentes em crianças com mais de dois anos de idade e no adulto. O reservatório é o próprio homem e a transmissão é fecal-oral, adquire-se a doença pela ingestão de água e alimentos contaminados (MARTINEZ, 2008).

2.7.2 *Salmonella enteridis*

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, consiste de bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos. Ao contrário de muitas espécies pertencentes a essa família, as salmonelas clinicamente importantes não fermentam lactose. crescimento. Há inúmeros meios seletivos para o isolamento desses agentes. Os mais importantes são: o meio Verde brilhante, o MacConkey, o Agar Sulfito de Bismuto (ASB). A maioria das salmonelas utiliza seletivamente o selenito de sódio e o tetrionato de sódio e, desse modo, podemos recuperar um pequeno número de organismos em amostras contaminadas. Temperatura para ótimo crescimento é de 37°C, mas pode também crescer a 43°C; característica freqüentemente utilizada para reduzir o crescimento de contaminantes. Salmonelas produzem gás da glicose, podendo utilizar o citrato como fonte de carbono (LABACVET, 2007).

Reduzem o nitrato a nitritos, mas não produzem indol ou urease. São reagentes a lisina e ornitina descarboxilase. Gás sulfídrico (H₂S), geralmente é produzido pela maioria dos sorovares. Lactose não é fermentada a menos que a cepa do hospedeiro possua um plasmídio que codifique para a lactose como a *S. arizonae*. Algumas cepas de *S. arizonae* fermentam a lactose lentamente, outras rápidas (LABACVET, 2007).

A classificação e a nomenclatura das salmonelas sofreram várias modificações nos últimos anos. A classificação atual, baseada em estudos moleculares, divide o gênero em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (FERREIRA e CAMPOS 2008).

De acordo com Ferreira e Campos (2008), *S. enterica* por sua vez, é subdividida em seis subespécies. Na rotina utiliza-se para identificação o esquema de Kaufmann & White, que divide as salmonelas com relação aos seus antígenos somático(O), flagelar(H) e

capsular (Vi). Os sorotipos de *Salmonella* podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro particular ou podem ser encontrados em grande número de espécies animais (Ubiquitários). Por exemplo, o homem é o único reservatório natural de *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B e C. Alguns sorotipos são adaptados a uma determinada espécie de animal, enquanto outros podem infectar indiretamente o homem e uma grande variedade de animais, por exemplo, *S. enteridis* e de *S. typhimurium* (FERREIRA e CAMPOS, 2008).

As infecções por *Samonella* são geralmente autolimitadas. A administração de antibióticos no tratamento das gastroenterites nem sempre acelera a recuperação clínica sendo, inclusive, responsável pelo prolongamento do período de excreção do agente, além de determinar a emergência de amostras multirresistentes. As salmonelas infectam o homem e praticamente todos os animais domésticos e selvagens, incluindo pássaros, répteis e insetos. Essas bactérias, quando estão presentes em ambientes, água potável e alimentos devem-se à contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores. No homem, as salmonelas causam vários tipos de infecção, sendo as mais comuns a gastroenterite e febre tifóide (FERREIRA e CAMPOS, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Óleo essencial

O óleo essencial da hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) foi adquirido diretamente no comércio, na cidade de Patos – PB, no período de 06 a 10 de maio de 2011.

3.2 Microrganismos

Foram utilizadas neste trabalho quatro cepas sendo, *Salmonella enteridis* CDC 49812, *Staphylococcus aureus* ATCC 259223, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 adquiridas no laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Campus Patos – PB.

As análises das amostras foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Campus de Patos – PB, CSTR/UFCG.

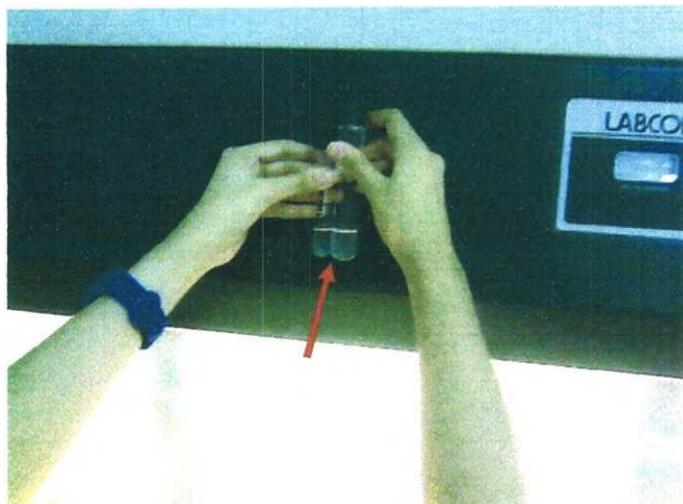
3.3 Meios de culturas

O meio de cultura foi preparado a partir do Caldo Mueller- Hilton (MH) 250 ml + Ágar Ágar(AA) 0,15%. Sendo o mesmo utilizado em tubos de ensaio para obtenção das diferentes concentrações do óleo essencial. Para o isolamento e inoculação das bactérias nas diferentes concentrações, utilizou-se o meio Ágar Mueller Hilton em placa de Petri.

3.4 Preparo e padronização das diferentes concentrações

Suspensões de cada microrganismo foram preparadas pelo método de suspensão direta das colônias (3 a 5 colônias semelhantes) em 3 ml de solução salina (NaCl 0,9%) estéril e ajustadas ao padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (NCCLS 2000 *apud* KLUCZYNIK *et al.*,2010) (Figura 2).

Figura 2 Padronização dos inóculos na escala McFarland



Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos

Em um tubo de ensaio foi adicionado 3,2 ml de caldo MH + AA e 0,8 ml do óleo essencial da *Mentha piperita L.* obtendo-se concentração de 20% (diluição padrão). Depois de homogeneizados com auxílio de um vortex, de cada tubo base foi pipetado 2 ml para o tubo seguinte contendo 2 ml de caldo MH + AA e depois de homogeneizar foi retirado 2 ml para o tubo seguinte sucessivamente até o sexto tubo obtendo-se as concentrações de 10% - 5% - 2,5% - 1,25% - 0,6% - 0,3% (Figura 3).

Figura 3 Distribuição das concentrações em tubos de ensaio.



Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos

Após a distribuição para cada série de concentrações foram pipetadas 10 μ l em cada tubo de ensaio da solução padronizada de cada espécie de bactéria. Para a multiplicação, as cepas foram transferidas para as respectivas concentrações do óleo e posteriormente foram incubadas a 35 ° C por 72 horas.

3.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hilton (AMH). Para cada diluição e cada espécie de bactéria foi feita a observação visual da atividade antibacteriana através da semeadura por estriamento do inóculo bacteriano, realizado no meio de cultivo com auxílio de uma alça de platina (Figura 4).

Em seguida as amostras foram incubadas a 35 ° C por 24 horas para se observar o desenvolvimento das cepas sob o efeito das diferentes concentrações do óleo.

Figura 4 Semeadura das cepas bacterianas por estriamento.

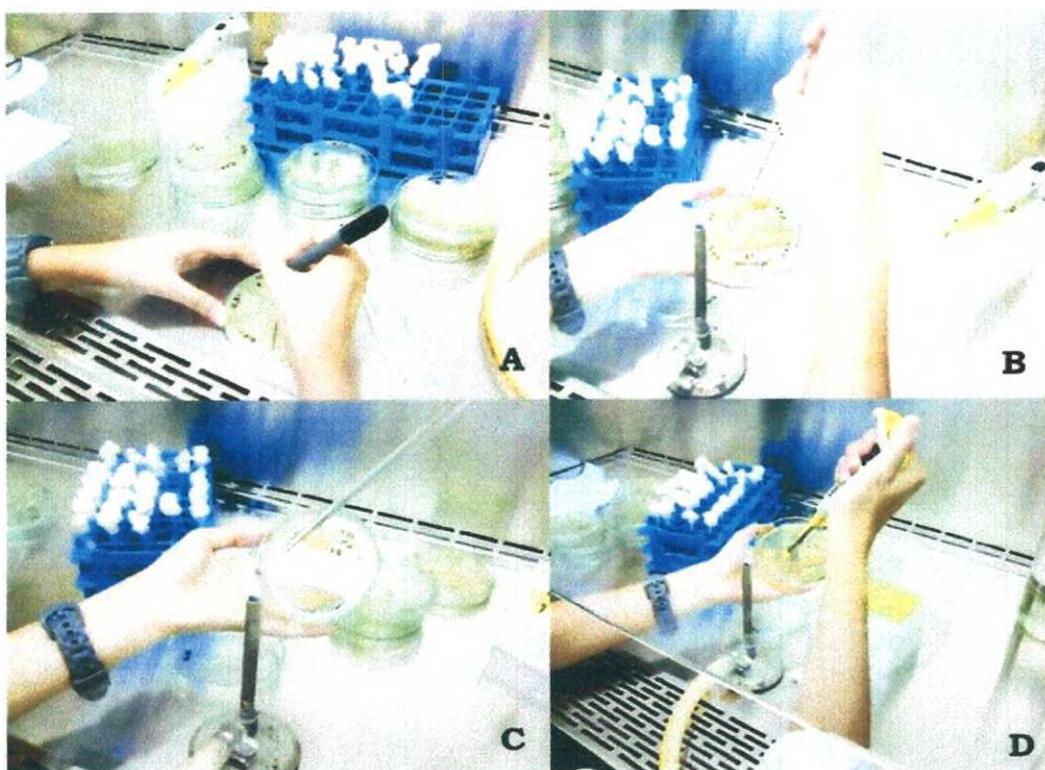


Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos

3.4.2 Curva de redução da atividade do óleo

Depois do período de incubação dos tubos, os inoculos foram transferidos para as placas de Petri onde foram feitas cavidades de 5mm de diâmetro com auxílio de um bastão de vidro nas placas com meio Ágar Mueller Hilton (Figura 5). Em seguida, foram pipetados 10 μ l nas quatro séries de 6 tubos equivalente a cada concentração. As análises foram realizadas em duplicadas e com controle positivo.

Figura 5 - A: identificação das diluições nas placas de Petri, B e C: confecção das cavidades com bastão de vidro, D: inoculação das bactérias + o óleo com o meio (CMH) nas cavidades.



Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos

Após esse período, foi medido o halo de crescimento, nas amostras, com auxílio de uma régua, para avaliar os dados quantitativos do efeito inibidor do óleo da *Mentha piperita L.*

3.5 Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de médias dos tratamentos (Tukey a 5% de significância) utilizando-se o programa estatístico ASSITAT versão 7.6 beta para Windows (SILVA e AZEVEDO, 2009). Os dados com interação significativa foram submetidos à análise de regressão. Os dados experimentais obtidos foram transformados em $x+0,5$ com o objetivo de ajustar a distribuição normal.

Para confecção do gráfico da curva de regressão, foi utilizado o programa da Microsoft Office Excel 2007.

Para avaliar o efeito inibitório do óleo essencial de *Mentha piperita L.* sobre quatro cepas de bactérias utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 7. Tendo como fatores as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, *Lysteria monocytogenes* e *Escherichia coli*, combinado a sete concentrações do óleo essencial *Mentha piperita L.*, T*; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6 e 0,3 % e uma testemunha positiva sem o óleo*, totalizando 28 tratamentos, com duas repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da atividade antibacteriana

Após 24 horas, pôde-se observar que 0,6% v/v apresentou-se como a CIM para o óleo essencial de *Mentha piperita* L., para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteridis*. e *Escherichia coli*, como indicam as setas na figura 6.

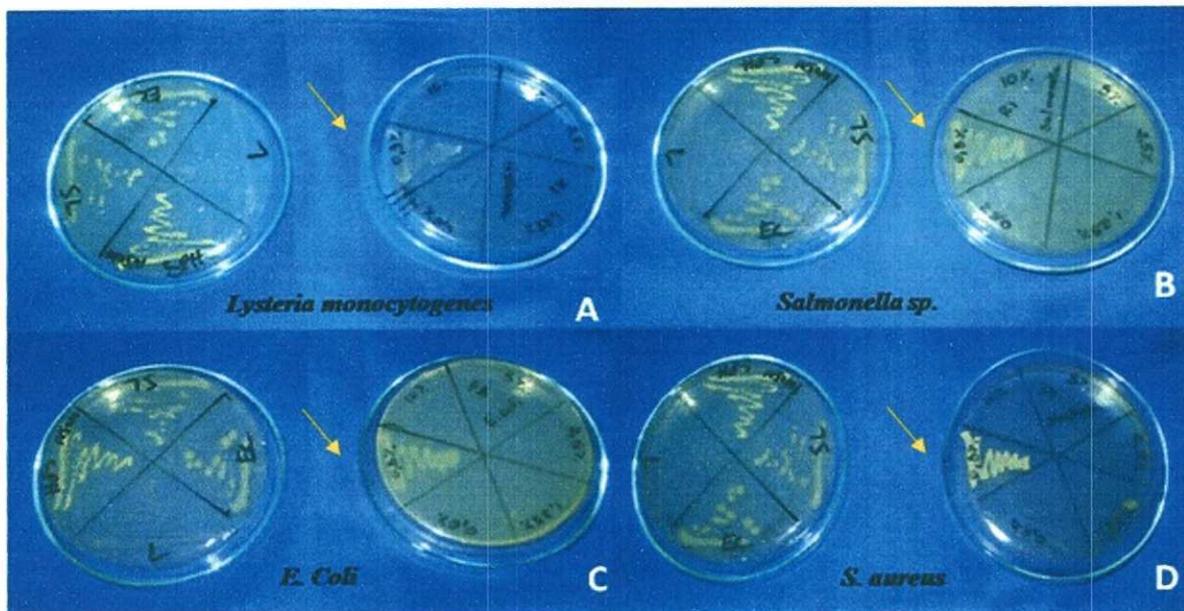
Moreira *et al.*, (2009) diz que, os óleos essenciais, como timol, mentol e eucaliptol, são compostos fenólicos que agem contra as bactérias rompendo a parede celular ou inibindo a ação enzimática.

Sendo, o mentol, o principal constituinte no óleo essencial da *Mentha piperita* L., pode-se considerar como sendo o responsável pelo efeito inibitório da hortelã-pimenta sobre estas bactérias.

A ação antimicrobiana de óleos essenciais de *Mentha suaveolens* Ehrh. sobre bactérias Gram positivas e negativas e fungos, foi verificada por Oumzl *et al.*, (2000) *apud* Michelin *et al.*, (2005). Dentre os constituintes aromáticos, o pulegona, foi o que apresentou ação mais potente. Imai *et al.*, (2001) *apud* Michelin *et al.*, (2005) testando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Mentha arvensis* L., verificaram ação contra as bactérias *Helicobacter pylori* e *S. aureus*, tanto linhagens sensíveis como resistentes a antibióticos.

Segundo, Pereira *et al.*,(2004) para o *Ocimum gratissimum* L. (alfavacão) está amplamente distribuída na região tropical. O óleo extraído dessa planta possui os seguintes compostos: 1,8 cineol, eugenol, metil-eugenol, timol, p-cimeno, cis-ocimeno e cis-cariofileno, e em diferentes concentrações inibiu crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 6 – A, B, C, D: efeito antibacteriano após 24 horas, amostras semeadas por estriamento em suas respectivas concentrações, comparadas ao controle positivo.



Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos

4.2 Análise dos halos de crescimento

Após 24 horas foi feita a medição dos halos de crescimento das bactérias de acordo com cada diluição, sempre comparando com um controle positivo para cada cepa (Figura 7).

Figura 7 – Medição dos halos de crescimento em suas concentrações após 24 horas



Fonte: Camila Carneiro Monteiro dos Santos.

De acordo com a tabela 1, na concentração 0,3% *Salmonella enteridis* sobressaiu em relação às outras. A *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*, apresentaram uma resposta mais intermediária ao efeito do óleo. Para *Listeria monocytogenes*, não houve formação de halo de crescimento.

Mas, a partir da concentração 0,6% observamos um efeito constante para todas as cepas nos fazendo-se perceber que à medida que aumentou a concentração do óleo não houve crescimento das bactérias. Confirmando a análise do estriamento nas placas de Petri, onde a concentração de 0,6% foi a CIM para todas as cepas.

Segundo Machado *et al.*, (2003) *apud* Michelin *et al.*, (2005) avaliaram 14 extratos de plantas medicinais brasileiras, utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos resistentes de importância médica. O extrato de *Punica granatum* L. (romã) mostrou-se eficiente contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.

Tabela 1 Efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de óleo essencial da *Mentha piperita* L. sobre os halos de crescimento da *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteridis* após 24 horas.

Bactérias	Concentrações do Óleo Essencial (%)						
	T	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10
	Diâmetro do halo de crescimento (x+0,5), cm						
<i>Listeria sp.</i>	1,20 b	0,50 c	0,50 a				
<i>Echerichia coli sp.</i>	2,00 a	0,95 bc	0,50 a	0,50 a	0,50 a	0,95 a	0,50 a
<i>Staphylococcus sp.</i>	1,10 b	1,25 ab	0,50 a				
<i>Salmonella sp.</i>	1,35 b	1,60 a	0,50 a	0,50 a	0,50 a	0,50 a	0,50 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

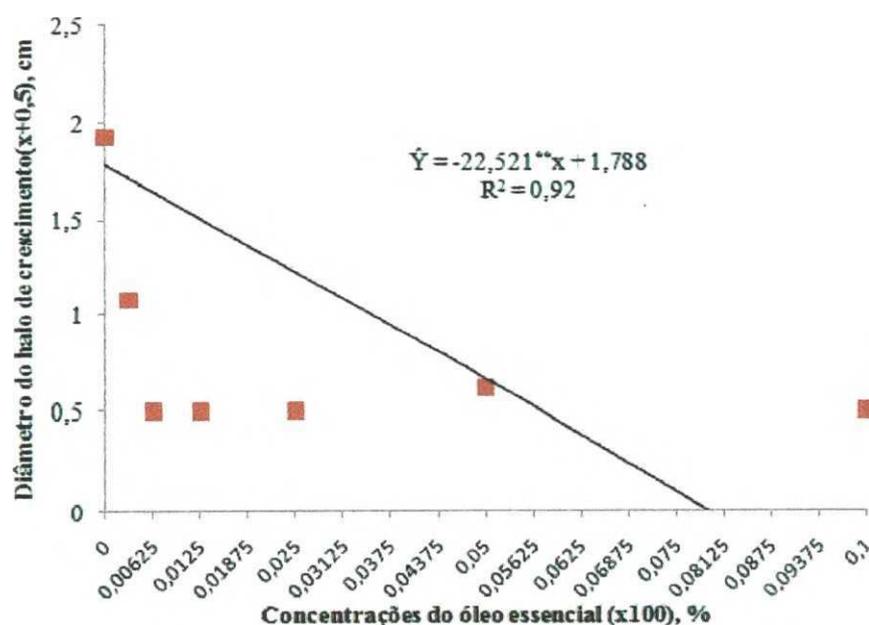
Na figura 8 e apresentada o comportamento do halo de crescimento das cepas bacterianas sob ação das diferentes concentrações de óleo de *Mentha piperita* L. após 24 horas. Observa-se diminuição do diâmetro do halo de crescimento das bactérias com o aumento das concentrações de óleo essencial, ajustando-se a um modelo linear. Estes resultados são normalmente obtidos quando o efeito bacteriostático é positivo.

Para SILVA *et al.*, (2009), quando comparados entre si, verificou-se que o óleo essencial de canela foi o de maior eficiência sobre as linhagens de *S. aureus* (0,047%v/v) e *E. coli* (0,09 %v/v), com os menores valores de CIM. Segundo MATAN *et al.* (2006) *apud* SILVA *et al.*, (2009) os compostos ativos presentes no óleo da canela, entre 50 a 60% de cinnamaldeídos e 4 a 7% de eugenol, apresentam a capacidade de interferir com síntese de algumas enzimas nas bactérias além de provocarem danos a estrutura da parede bacteriana.

O *S. aureus* apresentou maior susceptibilidade frente à ação dos óleos, enquanto concentrações maiores foram necessárias para inibir o crescimento de *E. coli*. Isto pode ser confirmado quando comparados os valores de CIM obtidos para óleo de alecrim, que foi extremamente baixo para *S. aureus*, entre 0,3 e 0,6%v/v e extremamente elevada para *E. coli*, inclusive ultrapassado o valor de 3,0%v/v que foi o maior utilizado no estudo. (SILVA *et al.*, 2009).

Os resultados *in vitro* desta pesquisa sugerem o uso potencial deste óleo na terapia de doenças infecciosas, mais com o indicativo de que estudos deverão ainda ser realizados objetivando testar a inocuidade deste produto bem como a necessidade de verificar as possibilidades de interferências destes óleos sobre a fisiologia e/ou estruturas das células bacterianas (SILVA *et al.*, 2009).

Figura 8. Comportamento do halo de crescimento das cepas bactérias sob ação do óleo da *Mentha piperita* L. após 24 horas.



5 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresenta efeito antibacteriano. E de acordo com a curva de regressão a concentração 0,6% é a CIM.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALMEIDA, C.F.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.**, n. 2, v. 15, 2006.

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.4, p.86-91, 2007.

ALVES, L.A.; FREIRES, I.A.; JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D.; CASTRO, R.D. Interferência de óleos essenciais sobre antibióticos utilizados no tratamento de infecções da cavidade oral. **Int J Dent.** Recife, v.10, n.1, p.26-31, 2011.
Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública.

BARRETO, M.L. Epidemiologia. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p. 111-116.

CAETANO, V.C.; SALTINI, D.A; PASTERNAK, J. Surto de salmonelose por *Salmonella enterica* em profissionais de saúde, causado por alimentos consumidos em uma festa de ano novo realizada dentro da Unidade de Terapia Intensiva. **Einstein.**; 2(1): 33-5, 2004.

CAMPOS, L.C.; SILVA, D.C.V. *Listeria monocytogenes*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p. 237-245.

DANTAS, L.I.S.; ROCHA, F.A.G.; MEDEIROS, F.G.M.; SANTOS, J.A.B. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis Schauer* sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **HÓLOS**, v. 5, p.114-123, 2010.

ERNANDES, F.M.P.G.; CRUZ, C.H.G. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microorganismos isolados do meio ambiente. **B.CEPPA**, Curitiba, v.25, n. 2, p. 193-206, 2007.

FARMACAM. Farmácia com manipulação e homeopatia. Hortelã. Disponível em: <<http://www.farmacam.com.br/monografias/hortelafarmacam.PDF>>. Acesso em: 20/06/11

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p.329-338.

GARDINER, M.D. Peppermint (*Mentha piperita*). **The Longwood Herbal Task Force**. p.1-22, 2000.

GOMES, M.J.P. Gênero *Staphylococcus* spp. **Microbiologia clínica**, UFRGS, 4º Semestre, 2010.

GOMES, M.J.P. Gênero *Escherichia* spp. **Microbiologia clínica**. UFRGS, 2011.

GOMES, T.A.T.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p. 281-287.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p.301-305.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p. 289-293.

JÚNIOR, W.P.E. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p.295-299

KLUCZNIK, C.E.N.; SOUZA, J.H.; PALMEIRA, J.D.; FERREIRA, S.B.; ANTUNES, R.M.P.; ARRUDA, T.A.; MORAIS, M.R.; CATÃO, R.M.R. Perfil de sensibilidade de *Salmonella* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais. **RBAC**. v. 42,n. 2, p.141-144, 2010.

LABACVET. **Microbiologia Clínica**. Enterobacteriáceas (*Salmonella* spp), Disponível em: < http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Salmonella201101_0.pdf> Acesso em: 28/06/11

LABACVET. **Microbiologia Clínica**. Gênero *Listeria* spp, UFRGS, 2007.

MARTINEZ, M.B. *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p.307-309.

MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: ATHENEU, 2008. p.271-279.

MÉTODOS de extração dos óleos essenciais. Disponível em: <<http://www.oleosessenciaisnaturais.blogspot.com>>. Acesso em: 23/06/11

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; M.O. PAGANELLI.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais . **Rev. Bras. Farmacogn**. São Paulo, v.15, n.4, p. 316-320, 2005.

MOREIRA, A.C.A.; PEREIRA, M.H.Q.; PORTO, M.R.; ROCHA, L.A.P.; NASCIMENTO, B.C.; ANDRADE, P.M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v.8, n.2, p.153-161, 2009.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, M.G.; TAGAMI, P.M.; LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.1, p.93-97, 2007.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev Saúde Pública.**, v.38, n.2, p. 326-328, 2004

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.** p. 1-25 , 2004?.

SILVA, F.A.S; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

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. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.3, p.257-262, 2009.

SILVEIRA, P.G.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova.**; Santa Catarina, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SPEROTTO, V.R **Atividade antibacteriana in vitro do decote de Achyrocline satureioides (Lam) D.C – Asteraceae – (“macela”) sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** 2010. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TEXEIRA, L.M.; SANTOS, K.R.N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia.** São Paulo: ATHENEU, 2008. p. 175-182.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita L.* cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.4, p.56-61, 2006.

VIEIRA, K.P.; LEDESMA, M.M.; ROSA, C. M.; HASSEGAWA, R.H. Contaminação de queijo minas frescal por bactérias patogênicas: um risco a saúde. **ConScientiae Saúde.**, v.7, n.2, p.201-206.