ANA PAULA BURATTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE BABOSA (*Aloe vera*)

FLORIANÓPOLIS - SC
2013

ANA PAULA BURATTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE BABOSA (*Aloe vera*)

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre Verzani Nogueira.
Co-orientador (a): Prof.ª Drª. Solange Teresinha Carpes.

FLORIANÓPOLIS - SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Buratto, Ana Paula
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE BABOSA (*Aloe vera*) / Ana Paula Buratto; orientador, Alexandre Verzani Nogueira - Florianópolis, SC, 2013.
58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Ação antibacteriana. 3. Produtos naturais. 4. Bactérias patogênicas. I. Nogueira, Alexandre Verzani . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram de alguma forma a concluí-lo, a aqueles que sempre depositaram a confiança em mim, e que torceram para que meus objetivos sempre fossem alcançados.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado me fortalecendo nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Alexandre Verzani Nogueira, pela orientação, dedicação e confiança, além do comprometimento no desenvolvimento deste trabalho e indispensável apoio a esta pesquisa.

À professora Dra. Solange Teresinha Carpes, pela co-orientação, aprendizagem e pelo apoio no decorrer de todo o trabalho, pois colaborou muito para a realização deste projeto, com sua infinita paciência e dedicação.

À responsável técnica pelos laboratórios de Química da UTFPR, campus Pato Branco, Edenes Maria Schroll Loss pelo auxílio e colaboração, e às laboratoristas pelo grande auxílio em todas as vezes que precisei.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa, disponibilizando infraestrutura de laboratórios e equipamentos.

Aos colegas de curso, pela amizade durante todos esses anos de convívio e troca de experiências, pois trilhamos juntos nesta etapa importante de nossas vidas.

Ao Jones Fernando que sempre esteve ao meu lado, apoiando e nunca permitindo que eu desistisse de meus objetivos, e que soube entender os momentos difíceis e ausência nas horas que precisei dedicar-me aos estudos.

À minha família pelo apoio, confiança e motivação, principalmente à minha querida avó, pelo seu apoio em mais uma etapa da minha vida, batalhando junto comigo com suas orações, força e convivência.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento.

Muito obrigada!

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente. É aquele que se melhor adapta as mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

BURATTO, A. P. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos Etanólicos de Babosa (*Aloe vera*). 2013. 47 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológica). Universidade Federal de Santa Catarina. Pato Branco, 2013.

Nas ultimas décadas, o uso de substâncias com ação antibacteriana determinou o surgimento de estudos com micro-organismos que sejam multirresistentes, com o intuito de isolar e identificar novos compostos que apresentam esta propriedade. Assim, os produtos naturais têm sido fontes para o desenvolvimento desses novos compostos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de Babosa (*Aloe vera*) frente as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076). A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada realizando os testes de difusão em ágar e microdiluição em caldo. O teste de difusão em ágar mostrou que o extrato etanólico de Babosa *in natura*, não foi capaz de inibir o crescimento das cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizadas no trabalho, na concentração de 133,0 mg mL^{-1} de extrato. O mesmo teste realizado com o extrato de Babosa seca, na concentração de 40,0 mg mL^{-1}, verificou-se que houve atividade antibacteriana em relação ao micro-organismo Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, e resultado nulo para as demais cepas. A concentração inibitória mínima foi entre 0,94 a 30,0 mg mL^{-1} para *Staphylococcus aureus*. Para as demais bactérias não houve ação antibacteriana, nas concentrações estudadas. A concentração bactericida mínima foi entre 3,75 a 30,0 mg mL^{-1} somente para a bactéria *Staphylococcus aureus*, podendo ser considerado um bactericida para este micro-organismo.

Palavras-Chave: Ação antibacteriana; Produtos naturais; Bactérias patogênicas.

ABSTRACT

BURATTO, A. P. Evaluation of Antibacterial Activity of ethanol extracts of Aloe (*Aloe vera*). 2013. 47 f. Completion of Course Work (Licenciatura em Ciências Biológica). Universidade Federal de Santa Catarina. Pato Branco, 2013.

In the last decades, the use of substances with antibacterial action has determined the emergence of studies with micro-organisms that which are multiresistant, in order to isolate and identify new compounds that have this property. Thus, the natural products have been sources for the development of these new compounds. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of ethanol extracts of Aloe (*Aloe vera*) against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 11778) and Gram-negative (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13,076). The agar diffusion test showed that Aloe ethanolic extract of fresh, was not able to inhibit growth of strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria used for the job, at a concentration of 133.0 mg mL^{-1}. The same test carried out with the dried *Aloe vera* extract, in a concentration of 40.0 mg mL^{-1}, it was found that there antibacterial activity against the micro-organism *Staphylococcus aureus* Gram-positive, and negative results for the other strains. The minimum inhibitory concentration was between 0,94 to 30,0 mg mL^{-1} for *Staphylococcus aureus*. For other bacteria no antibacterial action at the concentrations studied. The minimum bactericidal concentration was between 3.75 to 30.0 mg mL-1 only to *Staphylococcus aureus* bacteria, may be considered a bactericide for this micro-organism.

Keywords: Antibacterial activity; Natural products; Pathogenic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de Babosa (*Aloe vera*) com formato de lanças..... 23
Figura 2- Presença de gel incolor (mucilagem) na folha da Babosa. ... 23
Figura 3 - Estrutura química do 9,10 – antraquinona..... 24
Figura 4 - Estruturas químicas antraquinônicas: emodina, aloe-emodina, barbaloína e isobarbaloína, respectivamente. 24
Figura 5 - Estrutura de um glicosídeo antraquinônicos..... 25
Figura 6 - Estrutura química simplificada do polissacarídeo acemannan presente no gel da Babosa. 25
Figura 7 - (a) Corte transversal da babosa na forma *in natura* mostrando a camada externa e interna e (b) extrato etanólico da babosa *in natura*.34
Figura 8 – Imagens de preparação da (a) amostra de babosa desidratada por liofilização, (b) amostra de babosa seca triturada e (c) extrato etanólico de babosa. 34
Figura 9 - Esquema dos discos para difusão em ágar na placa de Petri. 36
Figura 10 - Esquema da microplaca de 96 poços utilizada no teste CIM. 37
Figura 11 - Placas do teste de difusão em ágar dos extratos etanólicos de babosa *in natura* frente às bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*. 40
Figura 12 - Placas do teste de difusão em ágar dos extratos etanólicos de babosa seca frente às bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*. 41
Figura 13 - Placas do ensaio CIM para as bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*..... 43
Figura 14 - Placas do ensaio CBM para as bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*..... 46
Figura 15 - Ensaio do tempo de ação contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para o (a) tempo de contato de 30 minutos e (b) tempo de contato de 60 minutos. 47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....22
2.1. BABOSA (*ALOE VERA*).....22
2.1.1 Características da Babosa.....22
2.1.2 Composição Química da Babosa.....23
2.1.3 Propriedades Biológicas da Babosa.....26
2.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....26
2.3. BACTÉRIAS.....28
2.3.1 *Staphylococcus aureu*.....29
2.3.2 *Bacillus cereus*.....30
2.3.3 *Klebsiella pneumoniae*.....30
2.3.4 *Salmonella enteritidis*.....31
3 OBJETIVOS 32
3.1 OBJETIVO GERAL.....32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....32
4 METODOLOGIA 33
4.1 MATERIAL.....33
4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DA BABOSA *in natura*.....33
4.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DA BABOSA SECA...34
4.4 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS.....35
4.5 COLORAÇÃO DE GRAM.....35
4.6 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....36
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....36
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....38
4.9 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATUAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
5.2 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS E COLORAÇÃO DE GRAM.....39
5.3 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....39
5.3.1 EXTRATO ETANÓLICO DE BABOSA *IN NATURA*.....39
5.3.1 EXTRATO ETANÓLICO DE BABOSA SECA.....41
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....42

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....45
5.6 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATUAÇÃo.....47
6 CONCLUSÃO 48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

1 INTRODUÇÃO

A *Aloe vera* (L.) Burm. f., conhecida popularmente no Brasil como Babosa, é uma espécie de planta pertencente à família Liliaceae, do gênero *Aloe*. Esta planta é nativa da África do Sul e foi introduzida no Brasil no inicio da colonização, se adaptando bem em várias regiões do país (FALEIRO *et. al*., 2009; TROLLES, 1999).

A Babosa tem um aspecto de um cacto de cor verde com folhas espinhosas e suculentas, onde encontra-se uma substância gelatinosa que pode ser extraída. Apresenta no parênquima de suas folhas mucilagem com ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antivirótica proporcionadas pela presença de antraquinonas como aloenina, barbaloína e isobarbaloína em sua composição química (KUZUYA *et al*., 2001; MORAIS *et. al*., 2005; FALEIRO *et. al*., 2009).

Diversos estudos realizados com *Aloe vera* tem demonstrado sua elevada atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em virtude dos compostos presentes no gel da babosa, como as antraquinonas (OLIVEIRA, 2007; LAWRENCE; TRIPATHI; JEYAKUMA, 2009; BEPPU *et al*., 2004; COOPOOSAMY & MAGWA, 2006). Os vegetais são capazes de produzir substâncias antibióticas através de sua atividade metabólica secundária, estas substâncias são utilizadas como mecanismo de defesa contra ação de micro-organismos (GONÇALVES *et al*., 2005).

Atualmente, diversas pesquisas de extratos vegetais com ação antibacteriana tem-se apresentado como uma alternativa para o combate dos micro-organismos, devido a resistência destes à múltiplas drogas, dessa maneira tem se realizado buscas contínuas de novos produtos antibacterianos que sejam eficazes e econômicos para combater infecções por micro-organismos patogênicos (PALMEIRA *et al*., 2010; SANTOS *et al*., 2007).

A pesquisa de novos agentes antibacterianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes, assim o estudo desses agentes tem grande abrangência em vários setores do campo farmacêutico e cosmético (PENNA *et al*., 2001). Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (HO *et al*., 2001; MICHELIN et al., 2005; OSTROSKY *et. al*., 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BABOSA (*Aloe vera*)

2.1.1 Características da Babosa

Aloe vera, do latim, "*aloés verdadeiro*", é uma planta perene da família das Liliáceas. Tem um aspecto de um cacto de cor verde, apresentando um talo curto com folhas grandes e carnosas, dispostas em forma de rosetas basais. São espécies de plantas conhecidas popularmente como babosa. São nativas do norte da África do Sul e foram introduzidas no Brasil, se adaptando bem em várias regiões do país. Atualmente, encontram-se catalogadas mais de 300 espécies de *Aloe* (CASTRO; RAMOS, 2002). Entretanto, poucas espécies são seguras para uso em seres humanos e tem sido exploradas pelas indústrias farmacêutica e cosmética, dentre as quais destacam-se a *Aloe vera*, *Aloe ferox*, *Aloe perryi* Baker, *Aloe arborensis* e a *Aloe barbadensis* Miller, sendo esta última reconhecida como a espécie de maior concentração de nutrientes no gel da folha (MARTINS, 2010; OLIVEIRA, 2007).

A *Aloe vera* tem folhas grossas, espinhosas de cor verde, com o formato de lanças que crescem numa formação de roseta, Figura 1. Suas folhas são suculentas e estão cheias de uma substância gelatinosa que pode ser extraída. Têm odor pouco agradável e sabor amargo. Quando adultas, suas folhas podem atingir até 75 cm de altura e chegar a pesar de 1,4 a 2,3 kg cada uma. As folhas do gênero *Aloe* funcionam como verdadeiros reservatórios de água, sendo a suculência de suas folhas e o metabolismo ácido das crassuláceas responsáveis pela sua natureza xerófita, isto é, adaptadas a ambientes secos (NI *et al*., 2004).

As folhas da babosa possuem uma face ventral que é plana, e uma face dorsal que é convexa, lisa e cerosa. Ainda, essas folhas constituem de duas partes, uma externa verde constituída basicamente pela epiderme, parênquima clorofiliano e feixe vascular, e outra interna, com parênquima mucilaginoso, espesso, denominado de polpa ou gel da folha. Possuem cor verde, ocasionalmente manchadas e com espinhos aglomerados ao redor das bordas (MARTINS, 2010; NI *et al*., 2004; OLIVEIRA, 2007).

Figura 1 - Folhas de Babosa (*Aloe vera*) com formato de lanças.

As folhas vistas após corte transversal apresentam a casca com cerca de 15 camadas de células, Figura 2. A casca produz carboidratos, lipídios e proteínas. Os feixes vasculares consistem de xilema, os quais carregam água, minerais e nitrogênio das raízes para a casca. O cálcio e o magnésio contribuem para o endurecimento da casca. O floema transporta matérias sintetizadas para as raízes e para outras partes da planta. Os túbulos pericíclicos conectam xilema e floema para nutrir as folhas novas. A mucilagem consiste de uma longa cadeia de polissacarídeos, cuja função é agir como um recipiente para a manutenção da esterilidade do gel. A camada de gel consiste de células parenquimatosas grandes que estocam água e grandes quantidades de carboidratos (MARTINS, 2010).

Figura 2- Presença de gel incolor (mucilagem) na folha da Babosa.
Fonte: GODOY, 2012.

2.1.2 Composição Química da Babosa

A atividade antibacteriana do gênero *Aloe vera* se deve a uma complexa composição de seus constituintes químicos, e são atribuídos principalmente a compostos fenólicos e polissacarídeos

presentes na folha. Entre os vários compostos fenólicos, destaca-se a classe das antraquinonas, que juntamente com as benzoquinonas e naftoquinonas, pertencem ao grupo das quinonas (EL-SHEMY *et al*., 2010).

As antraquinonas, Figura 3, são quimicamente definidas como substâncias fenólicas derivadas da oxidação do antraceno, formando núcleos fundamentais para a composição dos outros compostos antraquinônicos (ZHANG *et al*., 2001).

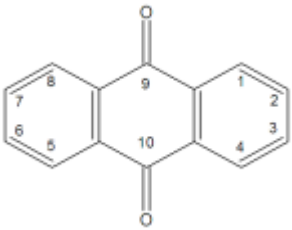


Figura 3: Estrutura química do 9,10 – antraquinona.
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009.

Os principais compostos antraquinônicos encontrados na babosa são aloesina, aloenina, aloe-emodina, emodina barbaloína e isobarbaloína, aloeresina, e isoaloeresina, conforme mostra a Figura 4 (EL-SHEMY *et al*., 2010; HU; XU; HU, 2003).

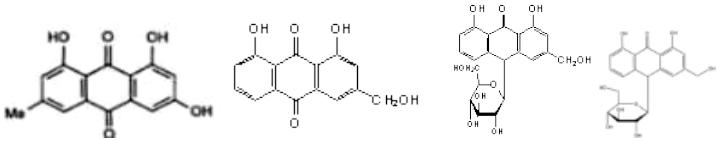


Figura 4 - Estruturas químicas antraquinônicas: emodina, aloe-emodina, barbaloína e isobarbaloína, respectivamente.
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009.

As antraquinonas são geralmente solúveis em água quente ou álcool diluído, o que facilita sua extração de plantas. As plantas produzem estas substâncias por causa do papel biológico em defesa química contra insetos fitófagos e outros patógenos, além de função alelopática, ou seja, inibição da germinação de outras plantas (DORNELES *et al*., 2003; HU; XU; HU, 2003).

A babosa apresenta também em sua composição química C-glicosídeos antraquinônicos (aloína A e B), que são polissacarídeos

com estrutura básica de uma antraquinona, como apresenta a Figura 5 (EL-SHEMY *et al*., 2010; DORNELES *et al*., 2003).

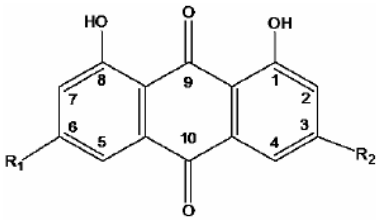


Figura 5 - Estrutura de um glicosídeo antraquinônicos.
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009.

Quanto aos polissacarídeos, o mais estudado até o momento, são as mananas-acetiladas, que são polímeros constituídos principalmente de unidades de manose com ligações β(1→4), com uma porcentagem de resíduos acetilados aleatoriamente nas posições C-2, C-3 ou C-6. A Figura 6 mostra a estrutura química simplificada do polissacarídeo acemannan (ABURJAI; NATSHEH, 2003; LEUNG *et al*., 2004; OLIVEIRA, 2007).

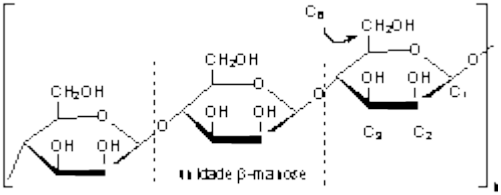


Figura 6 - Estrutura química simplificada do polissacarídeo acemannan presente no gel da Babosa.
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009.

Comumente a planta *Aloe vera* pode ser separada em dois produtos básicos, o gel e látex. O gel da babosa é a polpa da folha ou mucilagem, uma substância clara e pouco consistente semelhante a um gel obtido do tecido parenquimal que compõem a porção interna das folhas. Nesse gel contém polímeros de carboidratos, como glicomanas, além de vários outros compostos orgânicos e inorgânicos. O látex da babosa, comumente referido como "suco da babosa", é uma exsudação amarela e amarga dos túbulos pericíclicos

logo abaixo da epiderme das folhas obtido através de uma incisão das folhas sob a forma de um sólido cristalino denominado acíbar. Nesse látex contém os glicosídeos de antraquinona aloína A e B. É importante salientar que o gel da babosa não contém substâncias antraquinônicas (TYLER, 1993).

O gel de *Aloe vera* varia de 94 a 99% de agua e 1 a 4% de matéria seca, contendo 0,2 a 0,3 % de açúcares solúveis de baixo peso molecular (manose, glicose, arabinose, galactose e xilose) e 0,1 a 0,2 % de polissacarídeos. Além de polissacarídeos e água, outros compostos como lipídeos, proteínas solúveis, açúcares solúveis e alguns elementos minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio, fósforo, ferro, cobre e zinco, foram analisados na matéria seca. Os teores de lipídeos variam de 2,71 a 5,13%. Os teores de proteínas solúveis encontram-se em torno de 8,29% no gel e açúcares as encontrados a 27,81%, também no gel (MARTINS, 2010; OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2004; ZAGO, 2007).

2.1.3 Propriedades Biológicas da Babosa

Existem vários relatos atribuindo à babosa as mais variadas aplicações na medicina popular e, de fato, estudos vêm corroborando que a babosa possui um grande potencial terapêutico, principalmente em relação às atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral, antioxidante (ZHANG *et al*., 2001).

A planta *Aloe vera* (babosa) é muito utilizada na terapêutica e cosmética, e é rica em antraquinonas. As antraquinonas são compostos orgânicos que existem em abundância na natureza, sendo encontradas principalmente em plantas que pertencem às famílias Rubiáceas, Fabáceas, Poligonáceas, Rhamnáceas, Escrofulariáceas e Liliáceas. A *Aloe vera*, é uma espécie de planta pertencente à família Liliaceae, apresenta uma grande concentração de antraquinonas e estes componentes são objetos de estudo devido as suas propriedades biológicas (OLIVEIRA, 2007).

2.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um importante problema (CABRAL, 2008). Nas ultimas décadas, o uso de substâncias com ação antibacteriana determinou o surgimento de estudos com micro-organismos que sejam multirresistentes (SOUZA *et al*., 2003). Em resposta a resistência bacteriana, as principais

indústrias farmacêuticas, juntamente às universidades, tem concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com propriedades antibacterianas (CABRAL, 2008; TAYLOR *et al*., 2002). Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (CABRAL, 2008; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

O termo antibacteriano é designando para toda substância oriunda de seres vivos, micro-organismos ou vegetais, como também aquelas sintetizadas em laboratório com a capacidade de em pequenas concentrações apresentarem atividade letal ou inibitória contra espécies de bactérias e prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes (COSTA, 2007; RIBEIRO, 2008).

O modo de ação dos agentes antibacterianos é estabelecido de diversas maneiras, podendo ocorrer uma reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou destruição ou inativação funcional do material genético, pois os agentes antibacterianos podem interferir em diferentes níveis na síntese de ácidos nucleicos (ALMEIDA, 2007; SCHAECHTER *et al*., 2002).

Os agentes antibacterianos podem influenciar nas diversas atividades da célula bacteriana, inibindo seu crescimento ou causando a morte do micro-organismo. Essa ação inibitória pode ocorrer sobre a parede celular ou membrana celular dos micro-organismos, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou síntese de enzimas nas células microbianas, podendo levar á destruição destes micro-organismos (SARTORI, 2005). Quando a substância provoca a eliminação do agente bacteriano, é denominado bactericida. Por outro lado, se a substância somente inibir o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata, recebe a denominação de bacteriostático (RIBEIRO, 2009; TAVEIRA *et al.*, 2004).

O interesse pelas plantas para investigações de novos antibacterianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferente classe de metabólitos secundários, tais como as antraquinonas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos, pois podem agir também como antioxidantes anti-inflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas. Entre os produtos naturais, a babosa tem se destacado, tanto pelas suas diversas

propriedades biológicas, quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (ALENCAR *et al*., 2007; ANGELICO, 2001; CABRAL, 2008).

Entre todos os novos compostos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) ou outras entidades equivalentes de outros países, 28 % delas são totalmente de origem direta de produtos naturais e 39 % são de derivados destes. Assim, 67 % de todos os novos compostos aprovados são de fontes naturais ou derivadas de fontes naturais (CABRAL, 2008; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Existem vários testes para análise de sensibilidade antimicrobiana, desde métodos convencionais a metodologias mais modernas. Entre os mais utilizados pode-se citar os métodos da difusão em ágar do disco, microdiluição em caldo, entre outros. Entretanto, a análise da concentração inibitória mínima (CIM), isto é, microdiluição seriada em caldo, tem sido uma das metodologias mais aplicada, uma vez que este teste, além de avaliar a atividade antimicrobiana, possibilita a determinação da mínima concentração necessária para inibir o crescimento dos micro-organismos (NCCLS, 2003).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição é um ensaio quantitativo *in vitro* aplicado a avaliação da potência da atividade antibacteriana. Uma das vantagens deste método é a avaliação do comportamento de diferentes micro-organismos frente a concentrações crescentes dos compostos analisados. A menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias é denominada de CIM. O crescimento antibacteriano e a CIM são observados visualmente nas placas, sendo que as culturas que não apresentam crescimento são usadas para inocular placas com meio sólido, de forma a determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) (NCCLS, 2003).

2.3. BACTÉRIAS

Bactérias são micro-organismos unicelulares, procariontes (desprovidos de envoltório nuclear e organelas membranosas), com organização celular relativamente simples (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

As bactérias são microscópicas e apresentam tamanho médio de 1 a 2 µm por 1 a 4 µm, com membrana plasmática sem esteróis

apresentando cadeias de peptidoglicanos que vão influenciar na forma da bactéria dependendo do tamanho destas cadeias e da quantidade de interligações existentes entre os peptidoglicanos. As bactérias não possuem núcleo delimitado e seu material genético (DNA) encontra-se disperso no núcleo da célula, sendo uma molécula em fita de fita dupla circular, altamente compactada (SARTORI, 2005).

As bactérias podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias. Podem viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias) ou, ainda, serem anaeróbias facultativas. Ainda podem ser autotróficas (fotossintéticas ou quimiossintéticas) ou heterotróficas (saprófitas e parasitas).

Estão entre os organismos mais antigos, com evidência encontrada em rochas de 3,8 bilhões de anos (TORTORA *et al.*, 2000).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam diferenças marcantes sendo relevante ao estudo dos mecanismos de ação dos agentes antibacterianos (SARTORI, 2005).

Uma das diferenças em relação às células bacterianas é que as Gram-positivas possuem uma única camada de peptidoglicanos e as Gram-negativas têm uma segunda membrana lipídica na exterior da parede celular. Dessa forma, as bactérias que não possuem a camada com lipídios associados a polissacarídeos, Gram-positiva, são coradas com violeta de genciana, que impregna a camada peptidoglicana, adquirindo uma coloração roxo-azul. Já as bactérias que em sua morfologia apresentam as três camadas, Gram-negativa, não são coradas pelo corante, devido a não afinidade entre a pigmentação e a camada de lipopolissacarídeos, que também impede a fixação do corante com a camada de peptidoglicana subjacente, adquirindo uma coloração rosa-vermelho (SILVEIRA, 1995; MADIGAN *et al.*, 2004; BARBOSA; TORRES; FURLANETO, 1998)

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Estafilococos são cocos Gram-positivos da família Micrococcaceae, são amplamente encontrados na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa. O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas delas causadoras de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais (KONEMAN *et al.*, 2001). *Staphylococcus*

aureus é a espécie que geralmente está envolvida em infecções piogênicas humanas tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele ou em regiões mais profundas (SCHAECHTER *et al*., 2002; ANWAR; BOKHARI, 2003). *Staphylococcus aureus* é considerado um dos agentes patogênicos mais comuns responsável por severas infecções em humanos. Está amplamente distribuído na natureza, sendo os humanos e os animais seus principais habitat. Na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, especialmente os de origem animal e seus derivados, o *Staphylococcus aureus* destaca-se devido a sua alta prevalência e o risco de produção de toxinas causadoras de gastrenterites alimentares (RIBEIRO, 2009; ZECCONI; HAHN, 2000).

2.3.2 *Bacillus cereus*

O gênero *Bacillus* compreende bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativo formadores de esporos, pertencentes à família Baccilaceae. A importância desta espécie, *Bacillus cereus*, é a de ser responsável por intoxicações alimentares, podendo também participar de infecções cutâneas acompanhadas de necrose ou gangrena, bacteriana e septicemia entre outras (SARTORI, 2005). Algumas cepas são prejudiciais aos seres humanos e causam intoxicação alimentar, enquanto outras cepas podem ser benéficas, como os probióticos para animais. *Bacillus. cereus* é responsável por uma minoria de doenças transmitidas por alimentos (2-5 %), causando grave náusea, vômito e diarréia. A intoxicação alimentar transmitida por bacilos ocorre devido à sobrevivência dos endoesporos bacterianos quando o alimento é mal cozido (CHEN; MARTINEZ; MULCHANDANI, 2002; JORGENSEN *et al*., 2002).

2.3.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um gênero de bactérias, pertencente à família Enterobacteriaceae, do grupo Gram-negativa. Possuem a forma de bastonete, são anaeróbicas facultativas e encontradas em fezes, na água, no solo, em vegetais, cereais e frutas. A transmissão ocorre em ambiente hospitalar, através do contato com secreções do paciente infectado, desde que não sejam respeitadas normas básicas de desinfecção e higiene. Estas bactérias podem causar a doença de *Klebsiella pneumonia*, em que provocam alterações destrutivas aos pulmões humanos, inflamação e

hemorragia, com a morte celular (necrose), que às vezes produz um espesso escarro com sangue na forma de muco. Outro tipo de doença causada por estas bactérias é a pneumonia, tipicamente sob a forma de broncopneumonia e também bronquite. Além da pneumonia, *Klebsiella* também pode causar infecções no trato urinário. *Klebsiella* ocupa o segundo lugar para *E. coli* para infecções do trato urinário em pessoas idosas (POIREL *et al*., 2012; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al*., 2012).

2.3.4 *Salmonella enteritidis*

Salmonella enteritidis é um gênero de bactérias, pertencente à família Enterobacteriaceae. Possuem a forma de bastonetes, não são formadoras de esporos e pertencem ao grupo Gram-negativa. Obtém a sua energia a partir de reações de oxidação e redução, utilizando fontes orgânicas, e são anaeróbios facultativos. Estas bactérias causam doenças como a febre tifóide, febre paratifóide, e doenças transmitidas por alimentos. Muitas infecções são devido à ingestão de alimentos contaminados. *Salmonella* são facultativas e patogénicas intracelulares, que penetram nas células através de macropinosomes. A salmonelose é uma das principais doenças causada por esta bactéria pela ingestão de alimentos crus ou mal cozidos. A infecção geralmente ocorre quando uma pessoa ingere alimentos que contêm uma alta concentração das bactérias, semelhante a um meio de cultura (CHEN; MARTINEZ; MULCHANDANI, 2002; JORGENSEN *et al*., 2002)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de Babosa (*Aloe vera*) frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os halos de inibição *in vitro* dos extratos etanólicos de babosa (*Aloe vera*) através do método de difusão em ágar;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* dos extratos etanólicos de babosa (*Aloe vera*)
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) *in vitro* dos extratos etanólicos de babosa (*Aloe vera*);
- Avaliar o tempo de atuação da atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos frente às bactérias utilizadas do grupo Gram-positivas e Gram-negativas;
- Contribuir para ampliar o conhecimento da química, biologia e das propriedades farmacológicas desta espécie.

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus – Pato Branco, nos Laboratórios de Química da Coordenação de Química – COQUI, e no Laboratório da Universidade Aberta do Brasil – UAB, no pólo de Pato Branco, no período de dezembro 2012 à abril de 2013.

4.1 MATERIAL

A Babosa (*Aloe vera*) foi adquirida na forma *in natura*, no município de Pato Branco, Paraná. Para a realização das análises, as amostras de babosa foram limpas e cortadas em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, Figura 7 (a), para obtenção dos extratos etanólicos e armazenadas sob refrigeração a 4°C para posteriores análises.

4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DA BABOSA *in natura*

Os extratos etanólicos da amostra de babosa foi realizado segundo Carpes *et al*., (2008) e Alencar (2002). Para o preparo dos extratos de babosa, na forma *in natura*, foram pesados 2 gramas da amostra e transferidos para um tubo de ensaio, em seguida foram adicionados 15 mL de etanol 80% (v/v), obtendo uma concentração de 133,0 mg mL^{-1} de babosa, Figura 7. A extração foi realizada a 70 °C, em banho de água termostatizado, por 30 minutos, sob agitação constante. Após essa etapa as amostras foram filtradas e utilizadas nas análises de atividade antibacteriana.

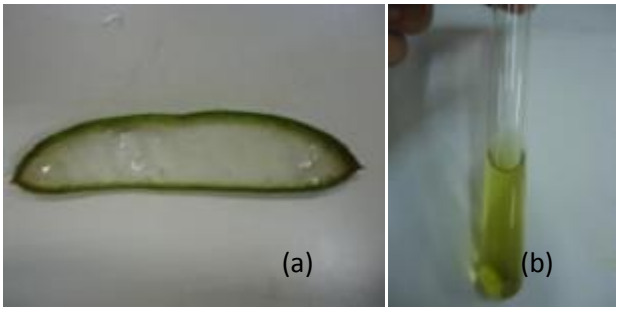


Figura 7 - (a) Corte transversal da babosa na forma *in natura* mostrando a camada externa e interna e (b) extrato etanólico da babosa *in natura*.

4.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DA BABOSA SECA

Os extratos etanólicos da amostra de babosa seca foi realizado segundo Carpes *et al.*, (2008) e Alencar (2002). A secagem da babosa foi realizada pelo processo de liofilização que se baseia na desidratação da amostra, em que a mesma é congelada e a água é retirada, por sublimação, ou seja, a água passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso, sem alterar as propriedades químicas e biológicas da babosa, Figura 8 (a). Após a desidratação, a amostra foi triturada em um moinho Marconi MA 630, Figura 8 (b). Para o preparo dos extratos etanólicos de babosa seca, foram pesados 2 gramas da amostra e transferidos para um tubo de ensaio, em seguida foram adicionados 50 mL de etanol 80% (v/v), obtendo uma concentração de 40 mg mL^{-1} de babosa, Figura 8 (c). A extração foi realizada a 70 °C, em banho de água termostatizado, por 30 minutos, sob agitação constante. Após essa etapa as amostras foram filtradas e utilizadas nas análises de atividade antibacteriana.

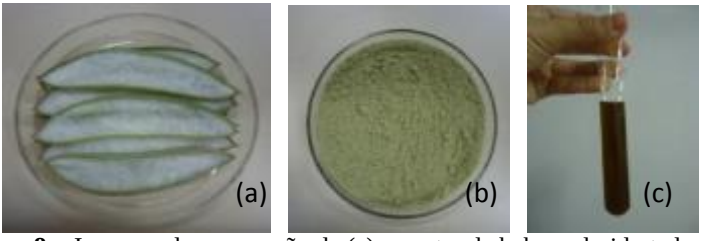


Figura 8 – Imagens de preparação da (a) amostra de babosa desidratada por liofilização, (b) amostra de babosa seca triturada e (c) extrato etanólico de babosa.

4.4 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Foram utilizadas cepas microbianas provenientes da "*American Type Culture Collection*" (ATCC) doadas para o Laboratório de Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Pato Branco, Paraná.

Neste trabalho, foram utilizadas quatro bactérias, duas pertencentes do grupo gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076) e duas do grupo gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778).

Os micro-organismos foram reativados a partir de culturas estoque em meio caldo BHI (Brain heart infusion), por 24 horas, a 37 ºC retirando-se duas alçadas de cada micro-organismo e transferindo para tubos contendo 10 mL de meio BHI esterilizado. Posteriormente, os micro-organismos foram cultivados em ágar BHI, por 24 horas, a 37 °C, utilizando a técnica de espalhamento por superfície, pipetando 100 µL dos tubos com os micro-organismos reativados anteriormente e espalhando com a alça de Drigalsky sobre a superfície do ágar.

Todas as cepas foram estocadas em ágar BHI sob refrigeração, de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

4.5 COLORAÇÃO DE GRAM

Para verificar as características morfológicas dos micro-organismos utilizados, realizou-se a técnica de coloração de gram. Inicialmente, preparou-se a fixação do esfregaço com culturas em meio líquido. Retirou-se uma gotícula da cultura com alça de platina esterilizada e colocou-se no centro da lâmina. Espalhou-se o material no centro, tomando cuidado para não atingir os bordos da lâmina, em seguida, esterilizou-se novamente a alça de platina na chama. Secou-se o esfregaço ao ar. Para fixação do mesmo, passou a lâmina, com o lado do esfregaço virado para cima, três vezes sobre a chama do bico de Bunsen. Após resfriamento, precedeu-se à coloração.

A coloração consistiu em cobrir o esfregaço com o corante cristal violeta e deixou-se agir por 1 minuto. Escorreu-se o corante e lavou-o com água destilada corrente. Cobriu-se com lugol e deixou-se 1 minuto. Escorreu-se e lavou-o com água corrente. Em seguida, lavou-se com uma mistura de álcool-acetona ate que todo o corante

seja removido. Lavou-o em água corrente. Depois, colocou-se o corante carbol-fucsina por 30 segundos. Escorreu-se o corante e lavou-o com água corrente. Secou-se a lamina e observou-se ao microscópio, utilizando objetiva de imersão. Esta metodologia foi baseada em Filho; Oliveira, 2007.

4.6 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Para a avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de babosa foi empregado o teste de difusão em ágar, segundo Blair *et al.*, (1958). Foram aplicados 10 µL dos extratos de babosa, na forma *in natura* e seca, cujas concentrações foram de 133,0 mg mL^{-1} e 40 mg mL^{-1}, respectivamente, em discos de papel de filtro Whatman nº 5 estéreis, dispostos nas placas de Petri, previamente inoculadas. Após a incubação em estufa a 37 °C por 24 horas, a atividade antibacteriana foi determinada através da medida do diâmetro da zona de inibição (mm) ao redor de cada disco. O solvente utilizado na extração, etanol 80 % (v/v), foi utilizado como controle negativo e o antibiótico Cefepime 30 µg mL^{-1} como controle positivo, conforme mostra a Figura 9. Os testes foram realizados em duplicata.

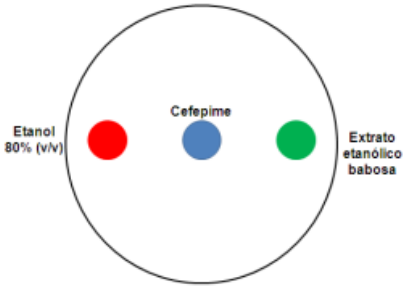


Figura 9 - Esquema dos discos para difusão em ágar na placa de Petri.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Esse método foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). As bactérias reativadas em placas de Petri, contendo ágar BHI, foram ressuspendidas em

tubos de ensaios contendo soro fisiológico (solução salina 0,86 %) esterilizado e ajustado para o valor de absorbância de 0,135, a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale a 1 - $2x10^8$ UFC mL^{-1} na escala 0,5 de Mc Farland. A solução salina estéril foi empregada como branco. Com a concentração ajustada, um volume de 50 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 50mL de caldo BHI, devidamente esterilizado.

Para iniciar o procedimento da reação nas placas de 96 poços, foram pipetados 190µL de caldo BHI inoculado, e em seguida adicionado 10 µL dos extratos de babosa, com concentrações que variaram de 40 a 0,93 mg mL^{-1}. Para confirmação dos testes, o caldo BHI inoculado foi adicionado na placa juntamente com etanol 80% v/v, etanol P.A. e o antibiótico clorafenicol 0,12 % (m/v). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, conforme apresentado na Figura 10. Com as placas de poços já preparadas, foram incubadas em estufa a 37 ºC por 24 horas.

Passado as 24 horas de incubação, foram adicionados 30 µL do corante resazurina 0,01 % (m/v). Nos poços que houve mudança na coloração, isto é, mudança de cor azul para cor rosa, o resultado é negativo, ou seja, houve crescimento bacteriano, já nos poços em que a coloração permaneceu inalterada, ou seja, de cor azul, o resultado é positivo, indicando que não houve crescimento bacteriano.

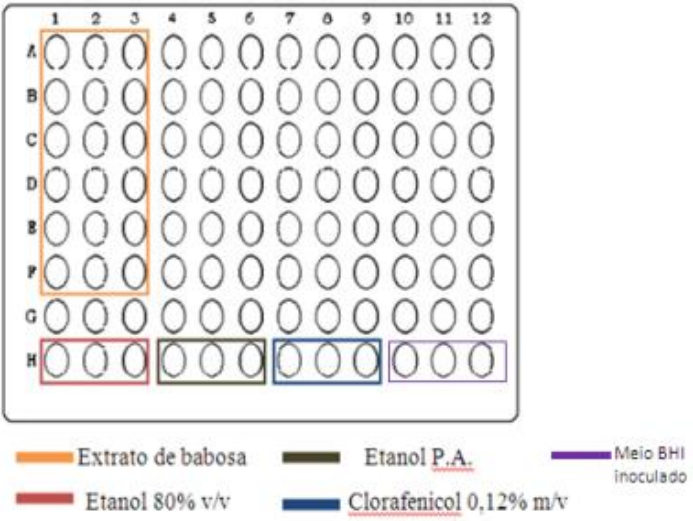


Figura 10 - Esquema da microplaca de 96 poços utilizada no teste CIM.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Essa análise foi realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM, onde foram transferidos uma alíquota de 10 µL provenientes dos poços onde não houve crescimento bacteriano, isto é, onde o resultado foi positivo, para placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e logo após levado a estufa por 24 horas a 37 ºC. A CBM foi considerada a menor concentração que causou 99,9 % de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar. Esta metodologia foi descrita de acordo com CLSI (2005).

4.9 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATUAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Este teste foi realizado através do Teste de Suspensão Simples segundo Girolometto (2005), onde foi feita a diluição logarítima dos inóculos, de 10^{-1} a 10^{-8} UFC mL^{-1}, que foram inoculadas em tubos contendo 9 mL de solução (4,5 mL de extrato de babosa e 4,5 mL de água estéril). Para tanto, foi seguido um protocolo de tempo (5, 15, 30 e 60 minutos) para a retirada de alíquotas e a inoculação de cada uma destas diluições em tubos contendo BHI. Para a leitura dos resultados, os tubos foram incubados em estufa aeróbia a 37 ºC por 24, 48 e 72 horas, sendo a interpretação feita pela turvação respectiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS E COLORAÇÃO DE GRAM

Após a reativação das culturas de bactérias em caldo BHI, realizou-se a técnica de coloração de gram. Esta técnica é amplamente utilizada na determinação inicial do caráter Gram-negativo ou Gram-positivo dessas bactérias, pois com base em sua reação à coloração pode-se identificar o grupo de bactéria, sendo gram-positivas ou gram-negativas. Na coloração de Gram, as bactérias gram-positivas coram-se em roxo, enquanto que as gram-negativas em vermelho.

Tal reação à coloração de Gram se deve às diferenças na estrutura da parede celular de células gram-negativas e gram-positivas, que permitem que o álcool descore as células gram-negativas, mas não gram-positivas. Para tanto, esta técnica foi importante para uma verificação inicial do caráter de cada bactéria, confirmando assim o seu grupo Gram- negativo ou positivo.

As bactérias usadas foram escolhidas por serem recomendadas como micro-organismos para testes de suscetibilidade antimicrobiana, sendo responsáveis por várias formas de infecções em humanos e animais, e adquirirem, com frequência, resistência aos antimicrobianos.

5.3 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

5.3.1 Extrato etanólico de babosa *in natura*

Este teste trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antibacteriano, essencialmente qualitativa. Por meio do teste de difusão em ágar foi possível verificar, de forma rápida e qualitativa, a atividade antibacteriana da babosa.

Os ensaios da atividade antibacteriana mostraram que o extrato etanólico de babosa *in natura*, não foi capaz de inibir o crescimento das cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizadas no trabalho, na concentração de extrato de 133,0 mg mL^{-1} . O teste do controle negativo com etanol 80% (v/v) também não apresentou ação inibitória, enquanto que o Cefepime, antibiótico usado como controle positivo, apresentou atividade,

inibindo o crescimento dos quatro micro-organismos utilizados nas análises, Figura 12.

A baixa concentração dos compostos bioativos presentes nos extratos de babosa *in natura* pode ser responsável pela baixa ou nenhuma atividade antibacteriana dos extratos, contra os quatro micro-organismos testados. É importante ressaltar que a atividade antibacteriana de um extrato de planta depende de muitos fatores que variam desde a espécie de micro-organismo até as condições de extração dos compostos bioativos.

Sendo assim, realizou-se a secagem da amostra de babosa, de modo a concentrar os compostos, pois o gel da babosa *in natura* possui em sua composição química, aproximadamente, 99% de agua e 1% de matéria seca, onde encontram-se presente os compostos bioativos, afim de potencializar a extração e verificar sua atividade antibacteriana.

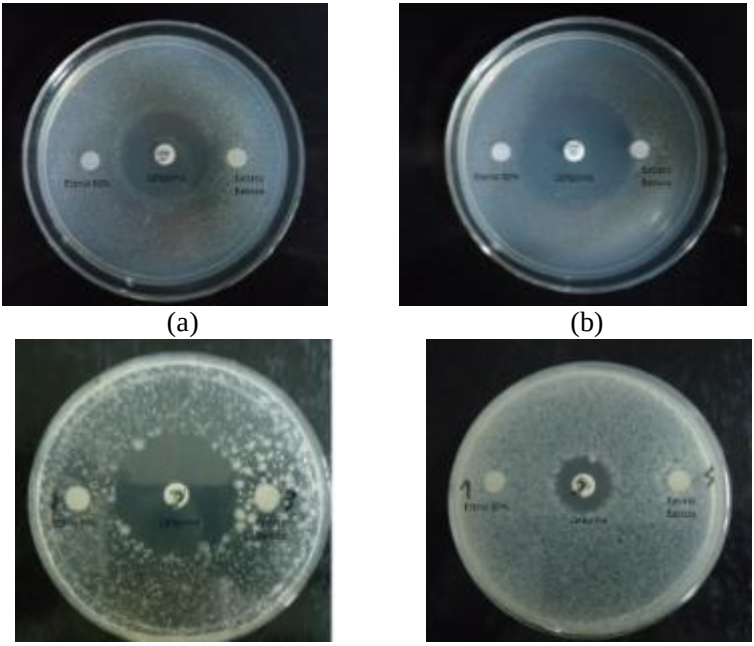


Figura 11 - Placas do teste de difusão em ágar dos extratos etanólicos de babosa *in natura* frente às bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*.

5.3.1 Extrato etanólico de babosa seca

Considerando que a ação antibacteriana dos extratos depende da sua composição química, realizou-se um teste com a babosa seca, com o intuito de concentrar os ativos responsáveis pelas propriedades biológicas. Neste teste verificou-se que houve atividade antibacteriana em relação ao micro-organismo Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, como mostra a Figura 13. Entretanto, não foi possível determinar o halo de inibição bacteriana, tanto do extrato quanto do controle positivo, o antibiótico Cefepime. O extrato etanólico de babosa apresentou resultado nulo para as demais cepas. Dessa forma, o teste de difusão em ágar não foi suficiente para avaliar a atividade antibacteriana da babosa em virtude dos resultados apresentados.

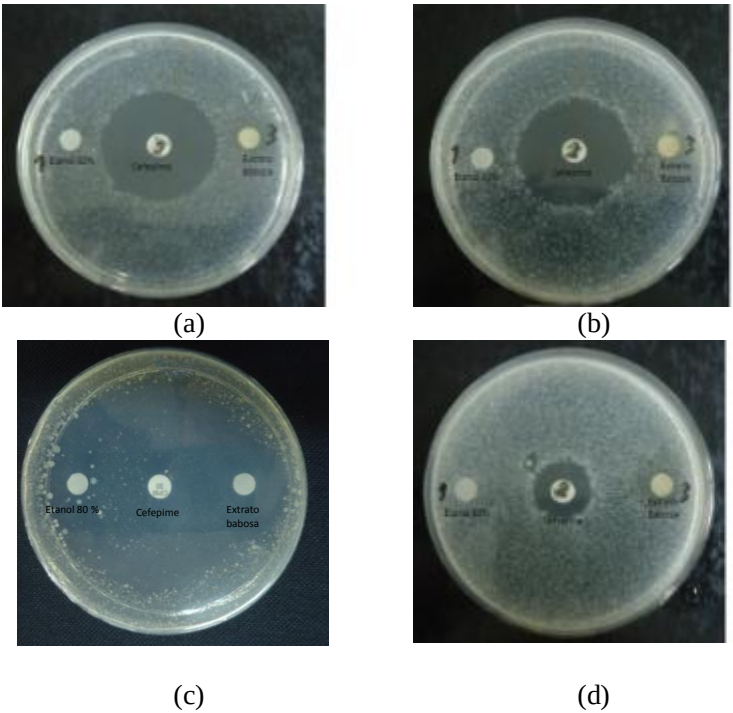


Figura 12 - Placas do teste de difusão em ágar dos extratos etanólicos de babosa seca frente às bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*.

Observa-se através das Figuras 12 e 13, que o mesmo antibiótico utilizado apresentou halos de inibição diferentes para cada bactéria testada. Sendo que, *Bacillus cereus* foi o micro-organismo que apresentou com maior resistência e as demais cepas foram mais sensíveis em relação ao antibiótico Cefepime.

O controle positivo Cefepime apresentou halos de inibição de, aproximadamente, 15 mm para *Klebsiella pneumoniae*, 20 mm para *Salmonella enteritidis* e 5 mm para *Bacillus cereus*. Para *Staphylococcus aureus* não foi possível obter o valor do halo de inibição.

Rodrigues *et al*., (2011), estudou o potencial antimicrobiano do gel de *Aloe vera* L.frente a bactéria *E. coli*. utilizando o gel puro, sem extração, obteve uma inibição do crescimento bacteriano para esta bactéria. Semenoffa *et al*., (2008), concluiu que frente ao microrganismo *Enterococccus faecalis* o gel de *Aloe vera in natura* apresentou uma leve inibição.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente nas placas da Figura 14.

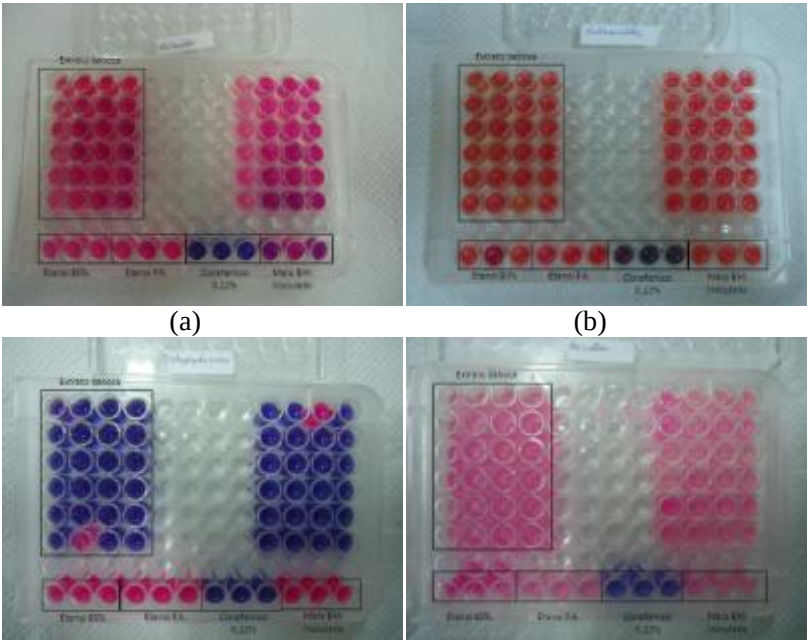
Nos poços que houve mudança na coloração, isto é, mudança de cor azul para cor rosa ou vermelho, o resultado é negativo, ou seja, houve crescimento bacteriano, já nos poços em que a coloração permaneceu inalterada, ou seja, de cor azul, o resultado é positivo, indicando que não houve crescimento bacteriano.

Nos poços em que não houve mudança de cor do corante rezasurina, ou seja, permaneceram azuis, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer mudança da coloração foi considerada que houve crescimento bacteriano, e os resultados podem ser vistos nas fotos das placas, as quais indicam ou não o crescimento bacteriano (Figura 14).

Nas figuras 12 a, b e d, onde tudo ficou rosa, houve crescimento, ou seja, o extrato não conseguiu inibir os micro-organismos em nenhuma das concentrações testadas. Então, o extrato de babosa não inibiu as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis*, nem *Bacillus cereus*, uma

Gram-positiva, sendo que a CIM do extrato de babosa para estas bactérias pode ser maior que 30 mg mL^{-1}.

Dessa forma, o extrato etanólico de babosa teve resultado positivo para a bactéria *Staphylococcus aureus*, para o qual se obtiveram valores de CIM de 30,0 a 0,94 mg mL^{-1}, sendo que esta concentração inibitória pode ser ainda inferior que o valor encontrado.



(a) (b)

(c) (d)

Figura 13 - Placas do ensaio CIM para as bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*.

Ao comparar os valores de CIM frente a *Staphylococcus aureus* quanto as outras bactérias, observa-se que a babosa não teve ação contra os outros micro-organismos. Tal resultado pode ter relação tanto com a composição do extrato, quanto com o perfil bacteriano das cepas que foram testadas, uma vez que os micro-organismos podem ter apresentado resistência superior as concentrações utilizadas do extrato etanólico da babosa.

Outro fator relacionado a não inibição, é que tendo em vista que o processo de liofilização, utilizado para secagem da amostra, e extração podem promover pequenas alterações na composição química do extrato, especialmente por ocorrer em baixas e altas temperaturas, respectivamente, que por vezes podem ocasionar a perda de compostos mais voláteis, podendo ser estes os responsáveis pelo aumento da atividade antibacteriana.

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* foi a mais sensível comparada às demais cepas. Por outro lado, as Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis*, e ainda *Bacillus cereus* foram mais resistentes à concentração do extrato (30 mg mL^{-1}).

Estes resultados concordam com os encontrados na literatura os quais demonstram que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, pois a membrana externa presente nessas bactérias forma um envelope complexo, protegendo-as contra a ação desses agentes antimicrobianos (OLADIMEJI; ORAFIDIYA; OKEKE, 2004; HOLLEY; PATTEL, 2005; VERAS, 2011).

Para HOLETZ *et al.* (2002), extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações abaixo de 100 mg mL^{-1} possuem boa atividade antibacteriana, concentrações entre 100 e 500 mg mL^{-1} possuem moderada atividade antibacteriana, concentrações entre 500 e 1000 mg mL^{-1} possuem fraca atividade antibacteriana, e concentrações acima de 1000 mg mL^{-1} possuem atividade inativa, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas. Dessa forma, considera-se que o extrato de babosa apresentou boa atividade frente a bactéria *Staphylococcus aureus.* E atividade inativa ou nula contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae, Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus.*

O extrato de babosa não apresentou atividade contra três dos quatro micro-organismos testados, não justificando, portanto, sua utilização no tratamento de doenças infecciosas causadas por estes micro-organismos (*Klebsiella pneumoniae, Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus.*). É possível que esta planta não possua efeito antibacteriano ou que o extrato da planta contenha constituintes antibacterianos em concentrações não suficientes para ser considerado efetivo para essas bactérias. Entretanto, sua atividade antibacteriana foi comprovada pela espécie *Staphylococcus aureus.*

De acordo com os resultados obtidos do teste de difusão em ágar já era esperado que as cepas não apresentassem nenhuma

concentração inibitória mínima frente as bactérias, exceto para *Staphylococcus aureus*, que apresentou uma baixa inibição. O extrato foi avaliado realizando o teste de CIM para todas as cepas, em que obteve resultados positivos somente para *Staphylococcus aureus*, nas concentrações estudadas.

Entretanto, apesar de descrito na literatura que a babosa possui importante atividade antibacteriana e também antifúngica, os extratos testados neste trabalho não proporcionaram a detecção dessa atividade frente as duas cepas Gram-negativas e uma cepa Gram-positiva.

É importante mencionar que os resultados obtidos neste estudo não sofreram influencia da diluição do álcool a 70% e álcool P.A., pois estes não apresentaram inibição no crescimento das bactérias. A análise demonstrou que o etanol utilizado nas extrações não apresentou nenhuma ação inibitória, enquanto que o clorafenicol, utilizado como controle positivo, apresentou a mesma ação com todas as bactérias utilizadas para a análise, inibindo o crescimento bacteriano.

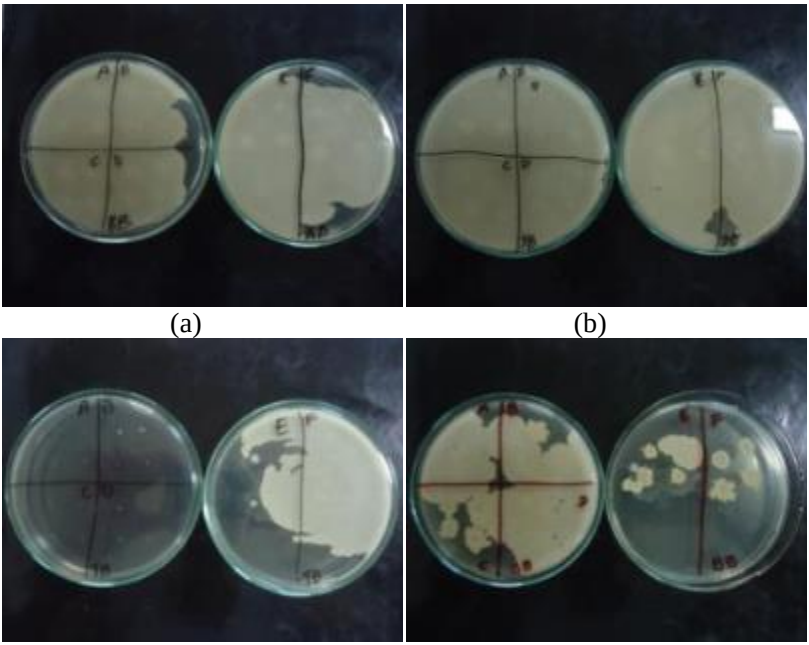
5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antibacteriano necessária para inviabilizar a célula microbiana, sendo possível avaliar se o composto é bactericida. Estas características dependem da espécie vegetal e suas propriedades biológicas, e das linhagens bacterianas testadas.

Assim como a CIM, o extrato de babosa teve ação bactericida somente para *Staphylococcus aureus*. apresentando CIM menor que 0,94 mg mL^{-1} e ação bactericida maior que 3,75 mg mL^{-1}, sendo que em concentrações mais baixas houve crescimento bacteriano na placa, como pode ser observado nos primeiros quadrantes (A, B, C e D) da Figura 15 c. Dessa forma, o extrato pode ser considerado um bactericida para esta bactéria. Entretanto, as bactérias *Klebsiella pneumoniae e Salmonella enteritidis*, ambas do grupo Gram-negativa, observa-se que as concentrações do extrato estudadas não foram suficientes para verificar a ação bactericida sobre estas cepas, pois apresentaram CIM e CBM maior que 30 mg mL^{-1}. Maiores estudos precisam ser realizados para determinar a concentração inibitória mínima com as demais bactérias analisadas neste estudo.

Normalmente, as bactérias Gram-positivas apresentam uma maior sensibilidade quando expostas aos extratos que as bactérias Gram-negativas. As Gram-negativas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos, conferindo maior resistência por evitar a difusão e acumulo do extrato na célula bacteriana.

Existem algumas explicações possíveis para as diferenças observadas na atividade antibacteriana do extrato, como as características estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a composição química da planta e concentrações testadas de cada extrato, e variações na composição química do extrato de acordo com as condições de crescimento da planta, a época de coleta e características do processo de extração.



(a) (b) (c) (d)

Figura 14 - Placas do ensaio CBM para as bactérias Gram-negativas: (a) *Klebsiella pneumoniae* e (b) *Salmonella enteritidis*, e para Gram-positivas: (c) *Staphylococcus aureus* e (d) *Bacillus cereus*.

5.6 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATUAÇÃO

A avaliação do tempo de atuação da atividade antibacteriana foi importante para verificar a viabilidade dos extratos etanólicos de babosa. Para tanto, um composto para ser considerado um bom agente antibacteriano, tem que, além de inibir o crescimento bacteriano, deve também apresentar um determinado tempo de ação contra as bactérias.

A Figura 16 apresenta o resultado dos tubos, no qual o extrato de babosa ficou em contato com as bactérias num protocolo de tempo equivalente a 30 minutos e 60 minutos. Após este tempo de contato, uma alíquota foi retirada e inoculada no caldo BHI. Observa-se, através dos tubos, que não houve inibição bacteriana em relação aos tempos estudados. O primeiro tubo, de cada figura, de cor verde é o controle positivo, e os outros tubos de cor laranja são os que contêm as bactérias e o extrato.

Quanto menor o tempo de contato e maior o tempo de incubação mais eficiente é a atividade antibacteriana da amostra. Entretanto, nas condições realizadas pelo presente trabalho, não foi possível obter estes resultados. Sendo que, o tempo de contato de 60 minutos não foi suficiente para que houvesse alguma ação contra as bactérias, e ainda o tempo de incubação de 24 horas foi o suficiente para verificar este parâmetro.

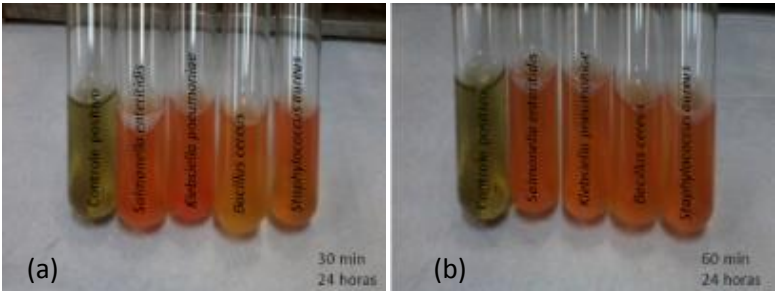


Figura 155 - Ensaio do tempo de ação contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para o (a) tempo de contato de 30 minutos e (b) tempo de contato de 60 minutos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho permitiram concluir que o extrato etanólico de babosa *in natura* não inibiu nenhum dos micro-organismos utilizados. Entretanto, quando utilizou-se o extrato seco, este inibiu a bactéria *Staphylococcus aureus* e não inibiu as demais cepas. Através da concentração inibitória mínima observou-se que a babosa possui boa atividade antibacteriana frente a bactéria *Staphylococcus aureus* e atividade inativa contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae, Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*, sendo que a concentração de 0,94 mg mL^{-1} foi suficiente para inibir o crescimento, podendo ainda ser menor. Já a concentração de 30 mg mL^{-1} não foi suficiente para inibir os demais micro-organismos. Na concentração bactericida mínima foi possível observar que o extrato de babosa teve ação bactericida somente para a bactéria *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 30 mg mL^{-1} a 3,75 mg mL^{-1}, e nenhuma ação bactericida para as outras três bactérias utilizadas.

Diante dos resultados apresentados e do que foi mencionado, cabe ressaltar que outros estudos devem ser realizados na tentativa estimular a investigação da aplicação deste produto natural de forma isolada ou combinada a outros medicamentos de forma segura. Além de realizar outros métodos de extração utilizando solventes com outras polaridades e também avaliar o potencial antibacteriano frente a outras bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants Used in Cosmetics. *Phytotherapy Research*, London, v. 17, p. 987-1000, 2003.

ALENCAR, S. M. *Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de Apis mellifera africanizada de diferentes regiões do Brasil.* 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; CASTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis**.** *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, A. A. P. *Atividade Antimicrobiana de Extratos e de Compostos Fenólicos e Nitrogenados do Café: Avaliação in vitro e em Modelo Alimentar*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimento) – Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimento. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ANWAR, M. S.; BOKHARI, S. R.; Antimicrobial Resistence of Community and Hospital Acquired *Staphylococcus aureus* Isolates to oxacillin and Glicopeptides. *J. Coll. Physie. Surg*. Pak., v. 13, n. 1, p. 3-6, 2003.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C. *Microbiologia básica***.** São Paulo: Atheneu, 1998, 196 p.

BLAIR, J. E.; BORMAN, E. K.;BYNOE, E. T.; UPDYKE, E.L.; WILLIANS, R. E. O. *Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation*. Atlanta, G. A: United States Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, 1958.

BEPPU H, KAWAI K, SHIMPO K, CHIHARA T, TAMAI I, IDA C, UEDA M, KUZUYA H. 2004. Studies on the components of Aloe

arborescens from Japan-monthly variation and differences due part and position of the leaf. Biochem Syst Ecol 32: 783-795.
CABRAL, I. S. R. *Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CARPES, S.T. PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; ALENCAR, S.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. *Química Nova*, v.31, n.7, p. 1660-1664, 2008.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. *Cultivo de três espécies de babosa: descrição botânica e cultivo de Aloe arborescens Mill. babosa-verde, Aloe saponaria (Aiton) Haw. babosa-listrada e Aloe vera L. Burm. f., babosa-verdadeira ou aloe-de-curaçau (ALOEACEAE)*. Porto Alegre: FEPAGRO, 2002, 12 p.

CHEN, W.; MARTINEZ, G.; MULCHANDANI, A. Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting *Salmonella*. Analytical *Biochemistry*. Vol. 280, n. 1, p. 166–172, 2002.

CLSI. *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico*: Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma M7-A6. Vol. 23, 2005.

COOPOOSAMY RM, MAGWA ML 2006. Antibacterial activity of aloe emodin and aloin-A isolated from *Aloe excelsa* (L.). ACAD J 5: 1092-1094.

COSTA, L. M. *Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do Gênero Capsicum*. 2007. Dissertação (Mestre em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2007.

DORNELES, D., WOUK, A.F., PONTAROLO, R., OLIVEIRA, A.B. Efeito de *Aloe vera* Linné sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 4, n.1, p.39-46, 2003.

El-Shemy HA, Aboul-Soud MA, Nassr-Allah AA, Aboul-Enein KM, Kabash A, Yagi A.Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes' activity by Aloe vera leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Curr Med Chem*., vol. 17, n. 2, p. 129-38, 2010.

FALEIRO, C. C.; ELIAS, S. T. H.; CAVALCANTI, L. C.; CAVALCANTI, A. S. S. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. *Natureza on line*, vol. 7, n. 2, p. 56-60, 2009.

FILHO, G. N. S; OLIVEIRA, V. L. *Microbiologia – Manual de Aulas Práticas*. 2ª edição revisada. Editora UFSC, Florianópolis, 2007.

GODOY, C. A. 2012. *Santa Babosa das feridas*. Disponível em: http://clovisdealmeida.blogspot.com.br/2012/05/santa-babosa-das-feridas.html. Acessado em: 14 de maio de 2013.

HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, H. S.; CHEN, C. P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea L. Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 53, p. 187-191, 2001.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituo Oswaldo Cruz*, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HU, Y. XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 51, p. 7788-91, 2003.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J.; FROST, J. A.; WARD, L.; HUMPHREY, T. J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter spp*. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 76, n. 1–2, p. 151–164, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLENS, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Medsi: Rio de Janeiro, p. 796-809, 2001.

KUZUYA, H.; TAMAI, I.; BEPPU, H.; SHIMPO, K.; CHIHARA, T. Determination of aloenin, barbaloin and isobarbaloin *in Aloe* species by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 752, p. 91-97, 2001.

LAWRENCE, R.; TRIPATHI, P.; JEYAKUMA, E. Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from *Aloe vera*. Brazilian Journal of Microbiology vol.40 no .4. São Paulo. 2009.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and Biological Characterization of a Polysaccharide Response Modifier from *Aloe vera* L. Var. *Chinensis (Haw) Berg. Glycobiology*, Oxford, v. 14, n. 6, p. 501-510, 2004.

MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M.; PARKER, JACK. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2004. 608 p.

MARTINS, M. J. *Uso da babosa (Aloe vera) na reparação de feridas abertas provocadas cirurgicamente em cães*. 2010. 56 f. Trabalho de conclusão de curso - Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, p. 316-320, 2005.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D'ARC P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios

Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Six Edition. NCCLS documente M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 US, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery**.** *Natural Products Report*, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 2215-234, 2000.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and Characterization of Structural Components of *Aloe vera* L. Leaf pulp. *International Immunopharmacology*, Amsterdam, v. 4, n. 14, p. 1745-1755, 2004.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; OKEKE, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 14, p. 162-168, 2004.

OLIVEIRA, E. T. *Micropropagação e Acompanhamento Bioquímico, Fisiológico e Nutricional da babosa (Aloe vera (L.) Burm. f) cultivada extra vitro em doses de nitrogênio*. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia. Conceitos e Aplicações*. v. 1. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.;

MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 77, p. 37-40, 2001.

POIREL, L.; MASKARI, Z. A.; RASHDI, F. A.; BERNABEU, S.; NORDMANN, P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 66. p. 304-306, 2012

RODRIGUES, D. R.; MARQUES, G.; SCOCCA, G. V.; KIMURA, L. Y. A.; SILVA, M. C. C.; SILVA, W. J. G.; BRANDÃO, W. Teste do Potencial Antimicrobiano do Gel de *Aloe vera* L. IX Simpósio de Base Experimental das Ciências Naturais da Universidade Federal do ABC - 12 e 13 de agosto de 2011.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; CONEJO, M. C.; ALBA P. A.; LÓPEZ-CERERO, L.; FERNANDEZ-ECHAURI, P.; PASCUAL, A. Combination of bla (VIM-1) and qnrS2 on the same plasmid in *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Seville. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. May, vol. 30, n. 5, p. 246-8, 2012.

SARTORI, M. R. K. 2005. *Atividade Antimicrobiana de Frações de Extratos e Compostos Puros Obtidos das Flores da Acmela brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) (Asteraceae)*. Mestrado em ciências farmacêuticas, Centro de ciências da saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHAECHTER, M. ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 642p.

SEMENOFF, T. A. D. V.; FERREIRA, W. R. S.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; BIASOLI, E. R. Efetividade *in vitro* de *Aloe Vera in natura*, gel de clorexidina a 0,12% e gel de clorexidina a 2% sobre *Enterococccus faecalis. Rev. odonto ciênc*. 2008;23(3):283-286.

SILVA, A. R. *Aromaterapia em dermatologia e estética*. Editora, São Paulo, Roca 2004.

SILVEIRA, V. D. *Microbiologia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. *Antraquinonas*. 2009. Disponivel em: http://sbfgnosia.org.br/Ensino/antraquinonas.html. Acessado em: 25 de maio de 2013.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M. B.; KRUEGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C.; *Método de Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos*. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. Univali, 2003. 239 p.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; PAUL, L. J. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery T*oday, New York, v. 7, n. 1, p. 1086-1091, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TROLLES, R. Babosa. *Ecologia e Desenvolvimento*, vol. 9, p. 54-55, 1999.

Tyler, V. The Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies, Third Edition. Binghamton, NY: *Pharmaceutical Products* Press; 1993.

VERAS, H. N. H. *CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE Lippia sidoides CHAM. (VERBENACEAE)*. Dissertação (Mestre em Bioprospecção Molecular) - Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2011.

ZAGO, Câncer tem cura!. 37 ed. Petrópolis: Vozes,5: 53; 8: 129-142; 10: 170, 2007.

ZHANG, Z.T.; DU, Y.J.; LIU, Q.G.; LIU, Y. Determination of the antioxidative effect of *Aloe vera*. *Nature Products Research Development* , v.13, p.45-46, 2001.