

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

MYLENA FERNANDA MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE *Aloe vera* E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO LIOFILIZADO**

TOLEDO
2021

MYLENA FERNANDA MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE *Aloe vera* E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO LIOFILIZADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Shioji Tiuman

TOLEDO
2021

MYLENA FERNANDA MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE *Aloe vera* E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO LIOFILIZADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em 04, de maio de 2021.

Banca examinadora

Prof^ª Dr^a Tatiana Shioji Tiuman
UTFPR, câmpus Toledo
Orientadora

Prof Dr Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof^ª Dr^a Juliana Cristhina Friedrich
Prati-Donaduzzi, Indústria Farmacêutica
Avaliadora

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais que sempre me apoiaram quando eu precisava e sabiam que eu era capaz, ao meu noivo por me ouvir e apoiar em todas as vezes que pensei em desistir. A todos amigos que direta ou indiretamente contribuíram com aprendizado ou palavras motivadoras. Agradeço a Deus, primeiramente por ter me dado forças para concluir mais uma etapa da minha vida. Aos professores que auxiliaram nas dúvidas e ideias, principalmente minha orientadora que sempre se manteve disponível para dúvidas, correções e ideias.

Resumo

A utilização de antibióticos vem aumentando gradativamente com o passar dos anos, fazendo com que a sociedade busque métodos alternativos de antimicrobianos como as plantas medicinais, principalmente métodos eficientes que garantam a melhoria na saúde. O presente trabalho buscou analisar as características físico-químicas e verificar a existência de atividade antimicrobiana do extrato etanólico liofilizado de *Aloe vera*. Na avaliação físico-química da planta foi determinado o pH, cinzas totais, água por dessecação (umidade) e solubilidade. As características físico-químicas obtidas para o vegetal em estudo foram pH de $4,35 \pm 0,7$; $1,42\% \pm 0,15$ de cinzas totais; $91,62\% \pm 1,72$ de umidade; e solubilidade em água destilada e álcool etílico. A metodologia empregada para verificar a capacidade antimicrobiana do extrato vegetal foi por difusão em ágar e microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato liofilizado de *Aloe vera*. Para a capacidade antimicrobiana do extrato, os resultados obtidos para difusão em ágar demonstraram que os microrganismos sensíveis foram *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 20 mg.mL^{-1} e 50 mg.mL^{-1} . Na microdiluição em placas a maioria dos microrganismos foram sensíveis ao extrato apresentando $\text{CIM} \leq 12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). Desta forma, foi possível concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados a outras pesquisas relacionadas e futuros trabalhos devem ser direcionados no sentido de isolar os compostos antimicrobianos do extrato de *Aloe vera*.

Palavras-chave: Babosa. Compostos bioativos. Bacteriostático.

Abstract

The use of antibiotics has gradually increased over the years, causing society to seek alternative methods of antimicrobials such as medicinal plants, especially efficient methods that ensure improvement in health. The present work aimed to analyze the physical-chemical characteristics and verify the existence of antimicrobial activity of the lyophilized ethanol extract of *Aloe vera*. In the physical-chemical evaluation of the plant, pH, total ash, water by desiccation (humidity) and solubility were determined. The physical-chemical characteristics obtained for the study plant were pH of 4.35 ± 0.7 ; $1.42\% \pm 0.15$ total ash; $91.62\% \pm 1.72$ humidity; and solubility in distilled water and ethyl alcohol. The methodology used to verify the antimicrobial capacity of the plant extract was by diffusion in agar and microdilution in broth to determine the minimum inhibition concentration (MIC) of the lyophilized extract of *Aloe vera*. For the antimicrobial capacity of the extract, the results obtained for diffusion in agar showed that the sensitive microorganisms were *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* at the concentration of 20 mg.mL^{-1} and 50 mg.mL^{-1} . In plate microdilution, most microorganisms were sensitive to the extract presenting $\text{MIC} \leq 12.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*). Thus, it was possible to conclude that the results obtained were satisfactory when compared to other related studies and future studies should be directed towards isolating antimicrobial compounds from *Aloe vera* extract.

Keywords: *Aloe*. Bioactive compounds. Bacteriostatic.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Exemplos de bactérias Gram-negativas e suas possíveis infecções.....	19
Tabela 2 - Exemplos de bactérias Gram-positivas e suas possíveis infecções.....	19
Tabela 3 - Microrganismos e seu respectivo antibiótico.....	25
Tabela 4 - Resultados amostrais de análise de solubilidade.....	28
Tabela 5 - Resultados do teste de difusão em ágar por discos do extrato de <i>Aloe vera</i> liofilizado.....	29
Tabela 6 - Resultados da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato de <i>Aloe vera</i> liofilizado.....	30

Lista de figuras

Figura 1 – <i>Aloe vera in natura</i>	15
Figura 2 – Esquema da metodologia de difusão em ágar.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	JUSTIFICATIVA	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	Plantas medicinais	14
4.2	<i>Aloe vera</i>	14
4.3	Caracterização físico-química	15
4.3.1	pH	15
4.3.2	Cinzas totais.....	16
4.3.3	Perda por dessecação (água e compostos voláteis).....	16
4.3.4	Solubilidade	16
4.4	Atividade antimicrobiana	16
4.4.1	Metodologia de difusão em ágar	17
4.4.2	Metodologia de microdiluição em caldo	18
4.5	Bactérias	18
4.5.1	Bactérias Gram negativas	18
4.5.2	Bactérias Gram positivas	19
4.6	Resistência microbiana	20
5	MATERIAL E MÉTODOS	21

5.1	Material vegetal	21
5.2	Microrganismos-teste	21
5.3	Preparo do extrato etanólico liofilizado de <i>Aloe vera</i>	22
5.4	Caracterização físico-química	22
5.4.1	Determinação do pH	22
5.4.2	Determinação de cinzas totais.....	22
5.4.3	Determinação de perda por dessecação	23
5.4.4	Determinação da solubilidade	23
5.5	Metodologia de difusão em ágar.....	24
5.6	Metodologia de microdiluição em caldo.....	26
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6.1	Caracterização físico química.....	27
6.2	Atividade antimicrobiana	28
7	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais e seus benefícios já eram conhecidos pelas antigas civilizações. As plantas medicinais vêm sendo aplicadas a diversos métodos de tratamento de doenças e procedimentos estéticos. Geralmente, no extrato da planta fica localizado o ativo, de forma que a extração deve ser realizada a partir das folhas, flores, caule ou raízes da planta, utilizando soluções com solventes apropriados. É possível a utilização das plantas *in natura*, seca, liofilizada ou o extrato (PARENTE *et al.* 2013).

Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece fitoterápicos como alternativa de tratamento, em destaque a *Aloe vera* (babosa) que é fornecida para uso no tratamento de psoríase e queimaduras. Isso demonstra que investimentos em pesquisas para a produção de medicamentos a partir da flora brasileira, contribuem para o acesso à população e seu uso racional, sendo de interesse público pesquisas voltadas para este ramo da indústria farmacêutica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Existem mais de 400 espécies de "babosa", nome popular das espécies de *Aloe vera*. Quando descoberta pelas antigas civilizações, eram utilizadas em tratamentos de queimaduras, devido ao alto teor de umidade da planta e a resposta imunológica rápida. Sua característica principal é a mucilagem ou "baba" no interior de suas folhas. Na composição da *Aloe vera* há grande concentração de antraquinonas, que dá o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório da planta, fazendo com que pesquisas sejam voltadas à determinação da concentração de antraquinonas na babosa (ALMEIDA, 2011).

A capacidade antimicrobiana do extrato de *Aloe vera* pode ser comparada com diversos antibióticos sintéticos, na qual os mesmos têm a função de eliminar microrganismos como bactérias e fungos do organismo vivo. Sendo uma possível alternativa para uso, quando os antibióticos sintéticos não realizarem seu efeito devido à resistência bacteriana, que se dá por exemplo, devido ao uso irregular durante o tratamento. Há testes, nos quais utilizam antibióticos sintéticos para controle positivo, sendo visto como uma comparação em relação aos extratos vegetais, os antibacterianos extraídos de plantas são considerados como benéficos para a sociedade (ZIMERMAN, 2010)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar as características físico-químicas e verificar a existência de atividade antimicrobiana do extrato etanólico liofilizado de *Aloe vera*.

2.2 Objetivos específicos

Realizar a identificação da planta por laboratório especializado;

Avaliar as propriedades físico-químicas da planta *in natura* como: umidade, pH, cinzas totais e solubilidade;

Elaborar o extrato etanólico de *Aloe vera*;

Realizar o processo de liofilização;

Verificar a capacidade antimicrobiana do extrato por metodologia de difusão em ágar e microdiluição em caldo para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) em microplacas.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao alto consumo de medicamentos antimicrobianos, muitas bactérias se tornam resistentes quando tomados incorretamente, principalmente quando ocorre a automedicação. As plantas medicinais podem ser fontes alternativas de antimicrobianos, quando formulados por laboratórios especializados ou utilizados *in natura*, sendo incentivo para novos estudos. Assim, podem ser aplicados em formulações de pomadas, cremes, cápsulas, elixires, comprimidos, géis, entre outros. Além de colaborar com o meio ambiente, no qual os medicamentos sintéticos devem cumprir processos de descarte rigorosos, os antimicrobianos gerados a partir de extratos naturais se tornam ecologicamente apropriados. Atualmente, diversos estudos e pesquisas voltados a plantas medicinais demonstram que a população está buscando métodos menos agressivos para o tratamento primário a saúde, fazendo com que ocorram avanços na área científica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais tem longo histórico e são reconhecidos como eficazes e seguros, além de ser amplamente utilizado em prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, sendo conhecida também como fitoterapia. As plantas são capazes de produzir diversas substâncias que auxiliam em sua defesa e proteção, sendo chamados de metabólitos secundários. Com isso, é possível que essas substâncias estejam ligadas ao efeito antioxidante, produção de hormônios vegetais e a defesa contra bactérias, vírus e fungos (BUENO *et al.*, 2016).

Plantas medicinais são todas as espécies vegetais que são utilizadas para algum propósito terapêutico. Sendo usado seu derivado vegetal que pode ser o extrato, óleo essencial, tintura, entre outras formas de obtenção. No Brasil, a flora se torna almejada por muitos, mas o aproveitamento e descoberta para estudos relacionados à aplicação de plantas em tratamentos de saúde são escassos. Há diversas plantas medicinais conhecidas popularmente, nas quais não há estudos químicos, farmacológicos ou toxicológicos sobre as mesmas (ALMEIDA, 2011).

4.2 *Aloe vera*

Pertence à família Aloaceae, a qual possui mais de 15 gêneros e 800 espécies, a *Aloe vera* é uma espécie de planta nativa do norte da África e cresce em locais com baixa umidade. As folhas são as principais partes da planta utilizada para fins terapêuticos. Todas as espécies deste gênero possuem características semelhantes como folhas verdes carnosas, espinhosas e alongadas contendo gel em seu interior (Figura 1) que é composto por polissacarídeos. É considerada uma planta perene, no qual seu ciclo de vida é longo e as folhas não caem (PARENTE *et al.*, 2013). Esta planta demora cerca de quatro a cinco anos para chegar a maturidade e suas folhas são divididas em duas partes: a parte externa, onde é possível extrair um suco amarelado, no qual tem um forte odor característico e é composto de aloínas como a barbaloina e isobarbaloina; a parte interna, que possui a mucilagem (gel) com alta viscosidade e incolor, no qual é composto por água e

polissacarídeos, além de diversos componentes como vitamina A, B, C e E, cálcio, magnésio e zinco, aminoácidos e enzimas (FREITAS *et al.*, 2014).

Figura 1: *Aloe vera in natura*



Fonte: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/aloe-vera-l-burm-f>>

As propriedades farmacológicas da *Aloe vera* são discutidas há séculos, de forma que eram utilizadas como laxantes, cicatrizantes e anti-inflamatórios. Uma das substâncias que tem essa propriedade é um polissacarídeo encontrado na polpa da folha. Esse polissacarídeo tem a função de induzir o sistema imunológico e outras células de defesa do corpo humano, aumentando a resposta inflamatória e imunológica. *Aloe* também tem características antimicrobianas que inibem o crescimento de diversas bactérias (AQUINO *et al.*, 2018).

4.3 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química de uma amostra de planta, descreve a identificação da espécie determinando as principais características presentes na amostra vegetal em questão.

4.3.1 pH

A determinação do pH é a quantidade de íons hidrogênio atuando na amostra. A água é um eletrólito fraco, fazendo com que a ionização forme hidrônio (hidrogênio

hidratado) e íon hidróxido, sendo assim a escala de pH é invertida em relação a quantidade de íon hidrônio, ou seja, quanto menor a concentração de hidrogênio na amostra maior o valor do pH. Para determinação do pH, é utilizado um pHmetro um equipamento potenciométrico (ANVISA BRASIL, 2019).

4.3.2 Cinzas totais

As cinzas totais é a quantidade de impurezas inorgânicas presentes na amostra, eliminando durante o processo, todas as substâncias orgânicas e inorgânicas sensíveis a altas temperaturas. O residual após a incineração em mufla são cinzas ou impurezas inorgânicas presentes na amostra que a compõem (ANVISA BRASIL, 2019).

4.3.3 Perda por dessecação (umidade e compostos voláteis)

A determinação de quantidade de água na amostra demonstra a concentração de água total da planta e compostos voláteis presentes. Sendo utilizado o método por dessecação e após realizado, calcula-se em porcentagem a quantidade de água presente no vegetal (ANVISA BRASIL, 2019).

4.3.4 Solubilidade

É a capacidade de uma substância se dissolver em determinados solventes, onde os demais componentes acrescentados ao solvente para teste de solubilidade são chamados de solutos. Essa dissolução se dá por conta da polaridade entre o solvente e o soluto (ANVISA BRASIL, 2019).

4.4 Atividade antimicrobiana

O conceito de antimicrobiano se dá a toda substância de mínima concentração, que tem o poder de inibir ou exterminar um microrganismo vivo, sendo esse antimicrobiano sintetizado em laboratório ou extraído de plantas (BURATTO, 2013).

Geralmente, a atividade antimicrobiana de extratos originados de plantas é determinada a partir da menor concentração de extrato que consiga inibir o crescimento

de um microrganismo. Existem diversas metodologias para determinar a ação antimicrobiana de um extrato vegetal em microrganismos, sendo alguns deles: métodos de difusão em ágar e métodos de diluição em caldo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Estudos realizados com a *Aloe vera* demonstraram que o extrato seco por metodologia em difusão em ágar por discos inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus*, na concentração de 0,94 mg.mL⁻¹ (BURATTO, 2013). Outro estudo feito com o extrato etanólico a 70%, demonstrou bons resultados para inibição de *Staphylococcus aureus*, na concentração de 0,25 e 0,125 mg.mL⁻¹ (OSTROSKY *et al.*, 2008). Testes realizados com *Escherichia coli* mostraram que não houve atividade antimicrobiana do extrato frente a essa bactéria (REIS, 2016). Pesquisas sobre o efeito do extrato glicólico de *Aloe vera* em *Candida albicans* demonstraram inibição em baixas concentrações do extrato, de modo que o de 5% inibiu o crescimento fúngico em 60% na metodologia de microdiluição (OLIVEIRA, 2008).

4.4.1 Metodologia de difusão em ágar

Os testes realizados por difusão em ágar são métodos de avaliação de atividade antimicrobiana de extratos vegetais, onde um microrganismo é testado frente ao extrato e é verificada a zona de inibição de crescimento, sendo analisada a menor concentração do ativo presente na substância do antimicrobiano. É utilizado um padrão conhecido para comparação do halo de inibição como antibióticos sintéticos dependendo de cada microrganismo-teste em questão. Neste caso, são medidos as margens do halo e os microrganismos podem ser considerados: sensíveis, onde o diâmetro do halo de inibição é maior ou igual a 3 mm comparado ao controle positivo; moderadamente sensíveis, o halo de inibição é maior que 2 mm quando comparado ao controle positivo; e resistentes, quando o halo de inibição é menor que 2 mm (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Frequentemente, nesta metodologia são utilizados discos estéreis feitos de papel filtro de 6 mm de diâmetro e o meio ágar Muller Hilton (AMH), e é realizada a aplicação da solução em diferentes concentrações a serem testadas nos discos de papel filtro. Como controle positivo é utilizado um antibiótico sintético determinado para cada microrganismo-teste e como controle negativo apenas o solvente orgânico utilizado para o preparo do extrato vegetal (OSTROSKY *et al.*, 2008).

4.4.2 Metodologia de microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo é uma técnica barata e segura, geralmente realizada em microplacas contendo 96 poços com volume de meio de cultura que variam de 0,1 a 0,2 mL. (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Normalmente o meio de cultura em caldo utilizado nesta metodologia é o caldo Mueller Hinton (MH), pois promove boa reprodutibilidade com diversos patógenos. O caldo MH é pipetado nos poços das microplacas, contendo ao menos um controle negativo e um controle positivo. Após o preparo das microplacas, deve-se inserir o microrganismo e a concentração a ser analisada do extrato vegetal. Para verificar se houve crescimento microbiano ou não, é possível observar a turbidez do meio. Quando turvo, o microrganismo é resistente ao antibacteriano; e quando o meio se encontra límpido, o microrganismo é sensível. Desta forma, este teste é considerado quantitativo, sendo possível a análise da turvação do meio o qual o extrato foi inserido (ANVISA BRASIL, 2003).

4.5 Bactérias

As bactérias são microrganismos unicelulares e procariontes, apresentam tamanho médio de 1 a 2 μm por 1 a 4 μm , sendo visíveis apenas microscopicamente. Sua forma depende de como a membrana plasmática ou a parede celular foi formada pela camada de peptidoglicano, sendo encontradas isoladas ou em colônias. São subdivididas em Gram positivas e Gram negativas, na qual possuem características próprias devido a composição e a estrutura da parede celular, que contribuem para a identificação de cada grupo para a explicação de estudos a ação de antimicrobianos (BURATTO, 2013).

4.5.1 Bactérias Gram negativas

Este grupo possui uma camada externa composta por lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos, além de sua camada de peptidoglicano. Na coloração de Gram, essas bactérias se encontram na coloração rosa. Sobretudo, as bactérias que são Gram negativas tem a forma de bacilos, são da família *Enterobacteriaceae* (VIEIRA et

al., 2012). A Tabela 1 mostra exemplos de bactérias Gram negativas e seus efeitos sobre o organismo vivo.

Tabela 1: Exemplos de bactérias Gram-negativas e suas possíveis infecções.

Nome da espécie	Causas
<i>Escherichia coli</i>	Infecção urinária; infecção intestinal
<i>Salmonella enterica</i>	Intoxicação alimentar; febre tifóide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecção auricular

Fonte: O autor (2019).

4.5.2 Bactérias Gram positivas

Este grupo possui apenas uma camada espessa de peptidoglicano, fazendo com que durante a coloração de Gram se diferencie do outro grupo de bactérias pela coloração violeta. Geralmente, a maioria das bactérias que tem forma de cocos, são definidas como Gram positivas. Bactérias da família *Micrococcaceae*, que incluem quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus* são Gram positivas (VIEIRA et al., 2012). A Tabela 2 demonstra exemplos de bactérias Gram positivas e seus efeitos sobre o organismo.

Tabela 2: Exemplos de bactérias Gram-positivas e suas possíveis infecções.

Nome da espécie	Causas
<i>Bacillus subtilis</i>	Intoxicação alimentar
<i>Bacillus cereus</i>	Intoxicação alimentar
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecção cutânea
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Infecção cutânea
<i>Kocuria rhizophila</i>	Endocardite e infecções pulmonares

Fonte: O autor (2019).

4.6 Resistência microbiana

A resistência microbiana se dá ao uso inadequado de antimicrobianos, onde o mesmo não realiza o efeito de modo correto, fazendo com que o microrganismo se torne resistente a determinado fármaco. A utilização de forma excessiva de antibióticos é considerada o maior fator para o desenvolvimento da resistência microbiana (ZIMERMAN, 2010).

O estudo de antibióticos a partir de plantas medicinais vem sendo cada vez maior na área farmacológica, agrônômica e fitoquímica. A dificuldade da aplicação de plantas medicinais está relacionada a ausência de estudos aplicados na área (SOUZA *et al.*, 2013).

Os principais mecanismos de defesa microbiana, são a alteração da permeabilidade da membrana, alteração no local de atuação do antibiótico, bombeamento do antibiótico para fora da bactéria fazendo com que ela não absorva seus componentes e a produção de enzimas que interfere no metabolismo do microrganismo fazendo com que destrua o antibiótico (ZIMERMAN, 2010).

5 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Câmpus Toledo. Foram utilizados os laboratórios de química orgânica e microbiologia, no período de fevereiro de 2020 a setembro de 2020.

5.1 Material vegetal

Aloe vera foi coletada *in natura* no município de Toledo-PR em janeiro de 2020 para análises e enviada ao herbário UNOP localizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Câmpus Cascavel, para identificação da espécie coletada e depositada com número de identificação. A espécie utilizada nas presentes análises é a *Asphodelaceae Aloe vera (L.)* Burm.f. e com número de identificação UNOP 10751. As amostras foram lavadas com água destilada e higienizadas com álcool etílico 70% e, na sequência, utilizadas nas análises de caracterização físico-química e elaboração do extrato para avaliação da atividade antimicrobiana.

5.2 Microrganismos-teste

Os microrganismos utilizados para teste frente ao extrato etanólico liofilizado de *Aloe vera* foram doados pelo laboratório de microbiologia da empresa Prati Donaduzzi, sendo oito microrganismos identificados e padronizados pela ATCC. Dentre eles são cinco Gram positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); três Gram negativos: *Salmonella typhi* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

5.3 Preparo do extrato etanólico liofilizado de *Aloe vera*

Foram pesados em uma balança semi-analítica, aproximadamente 50,0 g das folhas *in natura* e então, adicionaram-se com o auxílio de uma proveta, 500,0 mL de álcool etílico a 90% (v/v). Feito isso, triturou-se em liquidificador durante 5 minutos a 25°C, para total ruptura das células e liberação dos ativos da planta. Após a homogeneização, a solução foi filtrada a vácuo com papel filtro, envolvendo o kitassato com papel alumínio para evitar degradação de substâncias fotossensíveis contidas no extrato.

Após o processo de filtração, o extrato foi colocado em evaporador rotativo da marca SOLAB-126 a 45°C durante 4 horas, até evaporação total do solvente, restando somente a água e o extrato. Depois, foi armazenado sob refrigeração a -50°C para a liofilização do mesmo. A liofilização ocorreu durante 48 horas no liofilizador da marca LIOTOP –L101 e após liofilizado foi armazenado em dessecador até a pesagem. Todos os materiais utilizados foram limpos com álcool etílico 70% antes do uso (REIS et al., 2016).

5.4 Caracterização físico-química

5.4.1 Determinação do pH

Foi utilizada somente a mucilagem da *Aloe vera in natura*, sendo extraída a quantidade suficiente (aproximadamente 20 mL) para a leitura em pHmetro. Previamente, o equipamento foi calibrado com as soluções padrões do fornecedor (ANVISA, 2019). A análise foi realizada em triplicata e os dados apresentados em média e desvio padrão (DP).

5.4.2 Determinação de cinzas totais

Foram pesados, aproximadamente 3,0 g da planta *in natura* e transferidos para um cadinho de porcelana previamente calcinado por 30 minutos a 450 °C, resfriado em dessecador à temperatura ambiente e pesado. A amostra foi distribuída por todo o cadinho de forma uniforme e incinerado na mufla a partir de um gradiente de temperatura sendo 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C. Após o término do

ensaio, foi resfriado em um dessecador até temperatura ambiente, sendo pesado o cadinho com o residual (ANVISA, 2019). A análise foi realizada em triplicata e calculada média e desvio padrão (DP). Este parâmetro foi calculado de acordo com a equação (1).

$$\text{Cinzastotais(\%)} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P1= peso do cadinho;

P2= peso do cadinho + amostra;

P3= peso do cadinho + cinzas.

5.4.3 Determinação de perda por dessecação

Foram pesados aproximadamente 10 g da amostra *in natura* em triplicata, que foi macerada em pedaços para dessecação completa. A amostra foi transferida para um cadinho devidamente dessecado por 30 minutos e de peso conhecido. A amostra foi submetida a uma temperatura entre 100 a 105°C por aproximadamente 12 horas até atingir peso constante (ANVISA BRASIL, 2019). As análises foram realizadas em triplicata e este parâmetro foi calculado utilizando a equação (2) e posteriormente, calculada a média e desvio padrão (DP).

$$\text{Umidade(\%)} = \frac{P_3 - P_2}{P_1 - P_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P1= peso da amostra + cadinho;

P2= peso do cadinho;

P3= peso da amostra seca + cadinho.

5.4.4 Determinação da solubilidade

Primeiramente, foi pesado aproximadamente 1 g da mucilagem das folhas para cada tubo de ensaio, sendo realizado em triplicata. Cada tubo de ensaio recebeu 5 mL de um dos solventes sendo os seguintes: álcool etílico, metanol, éter etílico, água destilada e clorofórmio.

Para verificar se ocorre a dissolução da amostra vegetal, deve haver uma solução homogênea e quando ficam corpo de fundo, é considerada insolúvel na solução orgânica (ANVISA BRASIL, 2019).

5.5 Metodologia de difusão em ágar

Foi utilizado o ágar Mueller Hinton (AMH) para todas as bactérias. A quantidade de meio de cultura nas placas de Petri descartáveis (90x15 mm) foi de 10 mL por placa.

Para a padronização de cada microrganismo, este foi colocado em caldo MH e incubado por 24 horas para utilização do mesmo. Após, foi utilizada salina a 0,85% para padronizar os microrganismos em comparação com a escala 0,5 de McFarland. Com o auxílio de um swab estéril, foram inoculados os microrganismos nos meios de cultura, onde foi semeado em toda a placa o microrganismo com concentração conhecida (1:50) (ANVISA BRASIL, 2019).

Logo após o preparo das placas inoculadas, em uma placa de Petri esterilizada, foram organizados 3 discos estéreis de papel filtro de 6 mm para cada concentração do extrato, e com o auxílio de um pipetador automático foram aplicados 10 µL do extrato em duas concentrações (50 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹). Também foram utilizados 3 discos de papel filtro estéreis para o controle positivo conhecido para cada microrganismo, como especificado na Tabela 3; e 10 µL em 3 discos do controle negativo sendo caldo MH estéril. Em cada placa de Petri foram colocados 6 discos equidistantes, totalizando 12 discos para cada cepa. Os testes foram realizados em triplicata, sendo calculada a média e desvio padrão (DP).

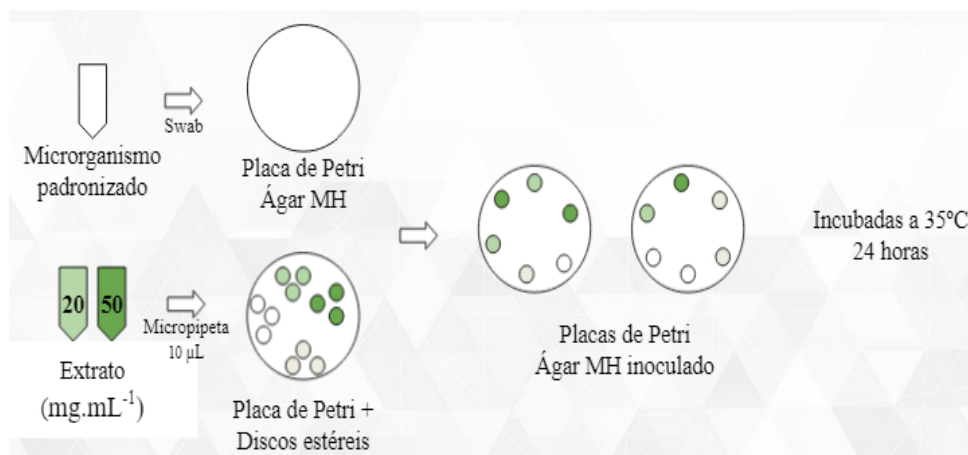
Tabela 3: Microrganismos e seu respectivo antibiótico.

Microrganismo	Antibiótico (μg)
<i>B. cereus</i> (ATCC 14579)	Cloranfenicol (30)
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	Vancomicina (30)
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	Gentamicina (10)
<i>K. rhizophila</i> (ATCC 9341)	Ampicilina (10)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Eritromicina (15)
<i>S. typhi</i> (ATCC 14028)	Ampicilina (10)
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	Bacitracina (10)
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	Tetraciclina (30)

Fonte: ANVISA BRASIL (2019).

Após os discos serem colocados nas placas com os microrganismos inoculados, foi aguardado 15 minutos para a solução dos discos difundir no ágar e as placas de Petri foram incubadas invertidas em incubadora a 35°C por 24 horas (Figura 2). Depois, foi realizada leitura do diâmetro do halo de inibição com o auxílio de uma régua milimetrada (ANVISA BRASIL, 2019).

Figura 2: Esquema da metodologia de difusão em ágar.



Fonte: O Autor (2020).

5.6 Metodologia de microdiluição em caldo

Foram utilizadas placas de microdiluição estéreis com 96 poços, onde foi usado o caldo MH para as bactérias. Foram pipetados 100 μL de meio de cultura em cada poço com o auxílio de uma micropipeta multicanal e após foram colocados 100 μL do extrato na concentração de 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos primeiros poços, seguido de 5 diluições seriadas, obtendo-se as concentrações de 12,50 (1:2); 6,25 (1:4); 3,12 (1:8); 1,56 (1:16); 0,78 (1:32); e 0,39 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1:64), sendo descartado 100 μL da última diluição. Logo em seguida, foram colocados 10 μL do microrganismo-teste padronizado com a escala 0,5 de McFarland diluído em salina a 0,85% (1:20) (ANVISA BRASIL, 2019).

Também foi feito controle positivo, utilizando o antibiótico ampicilina na concentração de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para todos os microrganismos-teste. Para tanto, foram pipetados 100 μL do antibiótico, homogeneizado e retirados 100 μL para obter a concentração 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1:2) do antibiótico. Para o controle negativo, foram pipetados 100 μL de caldo MH, homogeneizado e retirados 100 μL para igualar a quantidade de meio nos poços (ANVISA BRASIL, 2019).

Após, a placa de microdiluição finalizada, foi incubada a 35°C por 24 horas, e realizada leitura verificando a turvação do meio de cultura. Para confirmação da turvação foi aplicado 10 μL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) diluído em água estéril (0,5%), para confirmar a devida inibição ou crescimento microbiano nos poços. Foi incubada novamente nas mesmas condições, por aproximadamente 3 horas para realização da leitura.

De acordo com Pacheco (2015), o TTC é um corante utilizado para contagem de bactérias, no que se apresenta em um pó incolor e quando oxidado adquire a coloração vermelha, devido a formação do formazano. É possível mensurar a atividade metabólica celular pela desidrogenase, o que por sua vez é uma medida da respiração mitocondrial das células viáveis, onde a quantidade de formazano produzido está diretamente proporcional a quantidade de células vivas. Entretanto, as células metabolicamente inativas não produzem a quantidade suficiente de formazano para obter a mudança de coloração. Desta forma, para interpretação após incubação, qualquer mudança na coloração foi considerada como indicativo de crescimento bacteriano.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão (DP) e outros trabalhos foram utilizados como comparativos de resultados que utilizaram a mesma metodologia.

6.1 Caracterização físico química

A planta apresentou pH $4,35 \pm 0,07$. Aciole (2019) encontrou valores de 5,44 para o gel de *Aloe vera*, que é considerado um valor próximo ao obtido neste estudo. Já na pesquisa de Brígida *et al.* (2016), os pesquisadores encontraram valores de pH, sendo obtido o valor de 6,36. Essa variação de valores de pH, pode ser devido à influência do período em que foram coletadas as folhas da planta, a idade da folha extraída, o gel ou também o ambiente em que a planta se encontra plantada.

Para cinzas totais foi obtido o valor de $1,42\% \pm 0,15$. A Farmacopeia Brasileira (BRASIL ANVISA, 2019) diz que deve haver valor máximo de 4,0% de cinzas totais em *Aloe vera*, o que mostra uma baixa taxa de matéria inorgânica presente. Já no trabalho de Brígida *et al.* (2016), foram obtidos valores mais baixos que o encontrado no presente trabalho, sendo de 0,66% de cinzas totais.

Para perda por dessecação, a *Aloe vera* apresentou porcentagem de $91,62\% \pm 1,72$, ou seja, maior parte da planta é água e compostos voláteis. No trabalho de Brígida *et al.* (2016), o valor de umidade encontrado foi de 99,24% de umidade e compostos voláteis. Para Pedro *et al.* (2020), a planta apresentou valores de 89,45%, onde o valor encontrado no presente trabalho se encontra na média comparado aos outros autores.

Nos testes de solubilidade, a *Aloe vera* se apresentou solúvel em etanol e em água destilada. Já em metanol, éter etílico e clorofórmio não houve uma homogeneização da amostra com o solvente (Tabela 4), ficando como corpo de fundo. Na Farmacopeia Brasileira (BRASIL ANVISA, 2019) encontra-se dados de solubilidade, mostrando ser solúvel em água e etanol, insolúvel em éter etílico e não há especificação sobre outros solventes.

Tabela 4: Resultados amostrais de análise de solubilidade.

Solução	Amostra
Metanol	Insolúvel
Etanol	Solúvel
Água destilada	Solúvel
Éter etílico	Insolúvel
Clorofórmio	Insolúvel

Fonte: O Autor (2020).

6.2 Atividade antimicrobiana

Os ensaios microbiológicos realizados para o extrato de *Aloe vera* mostraram, por meio dos testes de difusão em disco, inibição para as bactérias *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, nas concentrações de 50 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹. Como é possível observar na Tabela 5, para os microrganismos *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, foram visualizados formação de halos de inibição, apesar de haver crescimento de colônias dentro do halo.

Para as outras bactérias, onde não foi observada formação de halo de inibição, devem ser avaliadas as concentrações do extrato utilizado, podendo ser testadas concentrações maiores ou outra metodologia de obtenção do extrato. Para Buratto (2013), não houve nenhuma inibição do extrato etanólico de *Aloe vera* na concentração de 40 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram positivas e Gram negativas utilizadas, sendo elas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e a autora descreve que o motivo pelo qual pode não ter comprovada a inibição é devido ao preparo de seu extrato que pode ter interferido na concentração reduzida de bioativos presentes.

Tabela 5: Resultados do teste de difusão em ágar por discos do extrato de *Aloe vera* liofilizado.

Microrganismo	20 mg.mL⁻¹	50 mg.mL⁻¹	Controle positivo
<i>B. cereus</i> (ATCC 14579)	0	0	2,97±0,14
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	0	0	2,56±0,02
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	0	0	2,47±0,12
<i>K. rhizophila</i> (ATCC 9341)	0,75±0,57	0,97±0,61	1,57±0,12
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0	0	1,02±0,02
<i>S. typhi</i> (ATCC 14028)	0	0	2,77±0,12
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0,66±0,52	0,68±0,48	2,63±0,05
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	0	0,98±0,71	2,87±0,09

0 = Não houve inibição

Fonte: O Autor (2020)

Nos testes de microdiluição em caldo, os resultados para o extrato etanólico liofilizado de *Aloe vera* foram observadas inibições em concentrações abaixo de 12,50 mg.mL⁻¹ (1:2) para diversos microrganismos. Na Tabela 7 pode-se observar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo, sendo que a maior concentração testada foi de 12,50 mg.mL⁻¹ (1:2) do extrato, e a menor concentração testada foi de 0,39 mg.mL⁻¹ (1:64).

Tabela 6: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Aloe vera* liofilizado.

Microrganismo	CIM (mg.mL ⁻¹)	Controle positivo (ampicilina 200 ug mL ⁻¹)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	6,25	Inibição
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	3,12	Inibição
<i>Eschericia coli</i> (ATCC 8739)	12,50	Inibição
<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	4,17	Inibição
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	>12,50	Sem inibição
<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 14028)	12,50	Inibição
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	12,50	Inibição
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,57	Inibição

Fonte: O autor (2020)

Para os oito microrganismos testados, apenas a *Pseudomonas aeruginosa* se apresentou resistente ao extrato etanólico de *Aloe vera*, onde a CIM para este microrganismo foi $> 12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o controle positivo utilizado (ampicilina $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) também não inibiu o crescimento do microrganismo. Para os demais microrganismos, a ampicilina se mostrou eficiente, inibindo o crescimento. Para o controle negativo (caldo MH), não houve turvação do meio, demonstrando a esterilidade do mesmo. Para Buratto (2013), as bactérias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis* apresentaram-se resistentes ao extrato de *Aloe vera* a 30 mg.mL^{-1} e para a bactéria *Staphylococcus aureus* obteve resultados positivos, onde o extrato inibiu o crescimento na concentração de $0,94$ a 30 mg.mL^{-1} verificando que menores concentrações devem ser testadas.

Na pesquisa de Pedro *et al.* (2020), o extrato metanólico de *Aloe vera* (folhas secas em estufa e em ambiente) não inibiu microrganismos como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida glabrata*, utilizando a concentração de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$

¹ e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Realizando o teste com as folhas verdes, obteve a inibição de *Bacillus cereus* na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de *Candida glabrata* em 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na pesquisa citada, *Pseudomonas aeruginosa* também foi resistente ao extrato de *Aloe vera*.

7 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento desta pesquisa foi possível verificar as características físico-químicas e a atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de *Aloe vera*. Com a caracterização físico-química, conclui-se que os valores obtidos para pH, cinzas totais e umidade estão de acordo com valores apresentados por outros autores e com a legislação, e para solubilidade há falta de pesquisas relacionadas a esse teste.

Para a atividade antimicrobiana, os resultados encontrados foram satisfatórios comparado a outras pesquisas relacionadas ao extrato de *Aloe vera*, onde na difusão em ágar, os microrganismos *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* se apresentaram sensíveis, apesar de haver crescimento microbiano dentro dos halos. Na determinação da concentração inibitória mínima, os resultados obtidos foram satisfatórios, pois 88% dos microrganismos testados apresentaram sensibilidade ao extrato liofilizado de *Aloe vera* nas concentrações testadas.

Desta forma, conclui-se que futuros trabalhos devem ser direcionados no sentido de isolar os compostos antimicrobianos do extrato de *Aloe vera*, com a finalidade de otimizar sua utilização no combate aos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, I. H. M. **Desenvolvimento de gel de babosa para a farmácia escola Manoel Casado de Almeida**. UFCG: Campina Grande, 2019. Acesso em: 10 de outubro de 2020.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3 ed. Salvador: EDUFBA, 2011. Acesso em: 10 de outubro de 2019.
- ANVISA BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. **Norma Aprovada**, v. 23, n. 2, p. 14-17, 2003. Acesso em: 09 de outubro de 2019.
- ANVISA BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019. Acesso em: 12 de outubro de 2019.
- AQUINO, D. N. *et al.* Estudo preliminar das propriedades farmacológicas e dos constituintes fitoquímicos da aloe vera (babosa). **Revista Conexão Eletrônica**, Três Lagoas, v. 15, p. 252-64, 2018. Acesso em: 06 de outubro de 2019.
- BRIGIDA, A. *et al.* Análise físico-química da mucilagem extraída de folhas de babosa (*Aloe vera*). **56 Congresso Brasileiro de Química**, 2016. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2016/trabalhos/7/9414-22472.html>>. Acesso em: 08 de agosto de 2020.
- BUENO, M. J. A.; MARTINEZ, B. B.; BUENO, J. C. **Manual de plantas medicinais e fitoterápicos: utilizados na cicatrização de feridas**. 2016, p. 28-35, UNIVAS: Pouso Alegre, 2016. Acesso em: 10 de outubro de 2019.
- BURATTO, A. P. **Avaliação de atividade antibacteriana de extratos etanólicos de babosa (*Aloe vera*)**. 2013. p.21-54. UFSC - Florianópolis, 2013. Acesso em: 09 de outubro de 2019.
- FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burn. F. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campina Grande, v. 16, p. 299-307, 2014. Acesso em: 06 de outubro de 2019.
- GUIMARÃES, C. C.; FERREIRA, T. C.; OLIVEIRA, R. C. F.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo da índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 15, p. 83-89, 2017. Acesso em: 10 de outubro de 2019.
- OLIVEIRA, I. B. **Estudo do efeito do extrato de *Aloe vera* sobre *Candida albicans***. UFSP: São José dos Campos, 2008. Acesso em: 08 de outubro de 2019.

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**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. Acesso em: 08 outubro 2019.

PACHECO, I. **Caracterização dos diferentes constituintes das resinas compostas, protemp 4TM, structur 3R e TAB2000**. 2015. Dissertação (Mestrado em medicina dentária) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz - Almada, Portugal, 2015. Acesso em: 28 de dezembro de 2020.

PARENTE, L. M.; CARNEIRO, L. M.; TRESVENZOL, L. M. F.; GARDIN, N. F. *Aloe vera*: características botânicas, fitoquímicas e terapêuticas. **Revista Arte Médica Ampliada**, Belo Horizonte, v. 33, p. 160-164, 2013. Acesso em: 06 de outubro de 2019.

PEDRO, G.R.B.S; RIBEIRO, L.A.F.; SANTOS, R.L.; NETA, L.C.S.; REIS, T.V. Avaliação antimicrobiana do extrato metanólico da *Aloe vera*. **Revista Científico**, Fortaleza, v. 20, p. 15-41, 2020. Acesso em 08 de julho de 2020.

REIS, S. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antimicrobiana de extratos de *Plectranthus grandis* (L.H.Cramer) *R. Willense* (Boldo) e *Aloe vera* (Linnaeus) *Burn* (Babosa) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 22, p. 39-46, 2016. Acesso em: 10 de outubro de 2019.

SOUZA, C. M. P.; BRANDÃO, D. O.; SILVA, M. S. P.; PALMEIRA, A.C.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. D. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande-Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campina Grande, v. 15, p. 188-193, 2013. Acesso em: 15 de outubro de 2019.

VIEIRA, D. A. P.; QUEIROZ, N. C. A. **Microbiologia geral**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Acesso em: 11 de outubro de 2019.

ZIMERMAN, R. A. **Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana**. Porto Alegre, Ed. MS, 2010. Acesso em: 15 de outubro de 2019.