



Propriedade antimicrobiana e potencial citotóxico *in vitro* do gel de *Aloe vera*: uma discussão sobre o uso em queimaduras

Antimicrobial property and *in vitro* cytotoxic potential of *Aloe vera* gel: a discussion about use in burns

J. L. Dias^{1*}; G. E. Lacerda¹; J. B. Cabral²; J. F. Moreira³; T. Dias⁴; G. N. L. do Nascimento¹

¹Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde – LACIBS. Curso de Enfermagem e Nutrição da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Quadra 109 Norte, Avenida NS-15, ALCNO-14, Plano Diretor Norte, 77001-090, Palmas – TO, Brasil

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Quadra 109 Norte, Avenida NS-15, ALCNO-14, Plano Diretor Norte, 77001-090, Palmas – TO, Brasil

³Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada – LAMBIO. Bloco II da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Quadra 109 Norte, Avenida NS-15, ALCNO-14, Plano Diretor Norte, 77001-090, Palmas – TO, Brasil

⁴Departamento de Química. Instituto Federal do Tocantins (IFTTO). Distrito Agroindustrial de Paraíso - Vila Santana (BR 153), CEP 77600-000, Paraíso – TO, Brasil

*jullianydias@uft.edu.br

(Recebido em 19 de setembro de 2017; aceito em 23 de abril de 2018)

Estudo experimental que teve por objetivo avaliar a propriedade antimicrobiana e o potencial citotóxico do gel da *Aloe vera*, a fim de discutir seu uso tópico em queimaduras. Para tanto, foram coletadas na cidade de Palmas-TO folhas da *A. vera*. O gel obtido após processamento das folhas foi dividido em dois grupos *in natura* (Amostra A) e liofilizado (Amostra B). A propriedade antimicrobiana foi realizada pelo método de macrodiluição em ágar e microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), para microrganismos comumente identificados em lesões infectadas de indivíduos queimados. O ensaio de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) foi realizado para avaliação da citotoxicidade. Os resultados sugerem que a *Aloe vera* possui atividade antimicrobiana de caráter bacteriostática para *S. aureus*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*, tanto na forma *in natura* como liofilizada. Quanto à citotoxicidade, não houve taxa de hemólise significativa ($p < 0,05$), bem como deformidade em membrana celular, que evidenciasse risco tóxico no uso do gel da planta para as concentrações máximas testadas 100% *in natura* e 20 mg/ml do extrato do gel liofilizado. No que tange ao uso popular no tratamento de queimaduras, as evidências deste estudo corroboram para a segurança do uso tópico. Entretanto, mais estudos de como ocorre a absorção e metabolização devem ser realizados.

Palavras-chave: Aloe, queimaduras, Medicina Tradicional.

This is an experimental study whose objective was to evaluate the antimicrobial property and the cytotoxic potential of *Aloe vera* gel and to discuss its topical use in burns. For that, the leaves of *A. vera* were collected in the city of Palmas-TO. The gel obtained after processing the leaves was divided into two groups *in natura* (Sample A) and lyophilized (Sample B). The antimicrobial property was performed by agar macrodilution in broth agar and microdilution for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM), for microorganisms commonly identified in infected lesions of burned individuals. The erythrocyte osmotic fragility (EOF) assay was performed to evaluate cytotoxicity. The results suggest that *A. vera* has bacteriostatic antimicrobial activity for *S. aureus*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *C. albicans*, both in *in natura* and lyophilized form. As for cytotoxicity, there was no significant hemolysis rate ($p < 0,05$) as well as cell membrane deformity, which showed a toxic risk in the use of the plant gel at the maximum concentrations tested 100% *in natura* and 20 mg/ml of the lyophilized gel extract. Regarding the popular use in the treatment of burns, the evidence of this study corroborate for the safety of the topical use. However, further studies of how absorption and metabolism occur should be performed.

Keywords: Aloe, burns, Traditional Medicine

1. INTRODUÇÃO

A planta *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, é uma herbácea que pertence à família Xanthorrhoeaceae. Suas folhas são estratificadas em duas partes principais, uma exterior composta pela casca verde que inclui os feixes vasculares, e outra que forma o tecido interior de aspecto mucilaginoso e incolor [1, 2, 3]. A parte interna, o gel, possui ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e cicatrizante [4], que justificam seu amplo emprego no tratamento de queimaduras [5]. O uso tópico da *A. vera* desempenha o papel de favorecer a maior oxigenação ao tecido através do aumento da vascularização e maior quantidade de colágeno na remodelagem do tecido cicatricial propiciando rápido reparo [6].

A queimadura é uma lesão dérmica, com ou sem comprometimento de demais tecidos, causada por um agente externo térmico, elétrico, químico ou radioativo [7]. São lesões graves, de tratamento prolongado que requer altos custos de cuidados de saúde pela complexidade assistencial [8].

O tratamento tópico é amplamente empregado em virtude da obstrução vascular ocasionada pela lesão térmica, que dificulta a chegada de antimicrobianos e de componentes celulares do sistema imune na área queimada [9]. Produtos impregnados com prata, em especial a sulfadiazina de prata são as substâncias tópicas mais utilizadas no tratamento de queimaduras por sua atividade antimicrobiana. Entretanto, o uso prolongado dessa substância demonstra um retardo na cicatrização como um efeito adverso da prata, além de causar toxicidade renal e leucopenia [10], sendo imperativa a necessidade de novas alternativas no arsenal terapêutico para esta enfermidade.

A sepse, complicação mais severa dos processos infecciosos, é a maior causa de morbimortalidade em pacientes queimados. Além do comprometimento da barreira epitelial, proteínas desnaturadas e tecidos necróticos no leito da lesão proporcionam um excelente meio para a proliferação de microrganismos [11].

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos detectados em pacientes queimados e sua letalidade é de aproximadamente 30%. Outros tipos de bactérias, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, bactérias gram-negativas, bem como fungos, especialmente a *Candida sp*, também podem ser encontrados e demandam atenção, pois estão associadas a graves infecções em pacientes queimados [12, 13, 14].

Apesar da ampla utilização medicinal das plantas, existe pouca informação disponível acerca dos seus constituintes, bem como sobre os riscos potenciais de seu uso à saúde humana, sendo o empirismo o guia para o uso popular dos vegetais com intuito terapêutico [15].

Neste contexto, a farmacovigilância de fitoterápicos e plantas medicinais é uma preocupação crescente, cujo desafio é identificar os fatores de riscos, mecanismos de ação e efeitos indesejáveis, padronizar termos e divulgar experiências, a fim de permitir seu uso seguro e eficaz [16, 17].

Diante do uso popular e da necessidade de se ampliar o conhecimento sobre as propriedades farmacológicas e os riscos de utilização de plantas medicinais, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana da *Aloe vera* frente a microrganismos comumente encontrados em quadros infecciosos de lesões por queimadura, bem como verificar a citotoxicidade da planta em eritrócitos humanos. Além disso, perfaz escopo deste estudo avaliar as evidências científicas envolvendo a atividade antimicrobiana da *A. vera* frente a diferentes microrganismos, comparando aos resultados obtidos pelos testes *in vitro* deste estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo do material vegetal

Foram coletadas folhas de *A. vera* nas hortas comunitárias do Plano Diretor do Município de Palmas – TO: 303 Norte (10°10'5"S; 48°20'26"O), 307 Norte (10°9'52"S; 48°21'12"O), 405 Norte (10°9'48"S; 48°20'44"O), 407 Norte (10°9'32"S; 48°21'7"O), 605 Norte (10°8'56"S; 48°20'1"O),

1006 Sul (10°14'49"S; 48°19'16"O), 1106 Sul (10°15'15"S; 48°19'16"O). Das oito hortas situadas no Plano Diretor, foi excluída a da quadra 1206 Sul pela ausência do cultivo da planta.

A coleta foi realizada nos meses de setembro e outubro de 2015, atendendo as recomendações botânicas de coleta. As plantas foram depositadas no Herbário do Norte do Tocantins, UFT, campus Cimba em Araguaína-TO, sob os números: HNOT000000031, HNOT000000032, HNOT000000033, HNOT000000034, HNOT000000035, HNOT000000036 e HNOT000000037.

O material vegetal fresco foi submetido ao procedimento de lavagem em água corrente e sanitização com uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 200 ppm por quinze minutos [18]. A mucilagem obtida foi liquidificada e congelada em ultra freezer sob a temperatura de -80 °C para garantir conservação.

A amostra composta por plantas de todas as hortas foi homogeneizada e dividida em:

1) amostra A (liofilizada) - amostra congelada e submetida ao processo de *freeze dryer* em liofilizador Terroni® Interprise I;

2) amostra B (*in natura*) – foi coletada e processada para extração do gel interno e mantida em congelamento em ultra freezer.

2.2 Preparo das soluções teste

A amostra A foi obtida através da solubilização do gel em água ultrapura e manutenção por 15 minutos em banho ultrassônico Unique® Maxiclean1600 UltraSonic Clean [19]. As concentrações teste obtidas foram de 2,5, 5, 10, 15 e 20 mg/ml.

A amostra B foi mantida em temperatura ambiente até o degelo, e pelo acréscimo de água ultrapura ao gel foram obtidas as proporções de 20, 40, 60, 80 e 100 %.

2.3 Ensaios da atividade antimicrobiana

As análises foram feitas em triplicata utilizando-se cepas American Type Culture Collection (ATCC) da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – (CMRVS) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As cepas selecionadas para o estudo foram às bactérias *Staphylococcus aureus* INCQS 00633 (ATCC BAA-977), *Enterococcus cloacae* INCQS 00074 (ATCC-130473), *Escherichia coli* INCQS 00325 (ATCC-35218), *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC-27853), *Kebsiella pneumoniae* INCQS 00147(ATCC-13883), *Acinetobacter baumannii* INCQS 00143 (ATCC- 19606) e o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231, CBS 6431).

Para o método de difusão em ágar, foi utilizada técnica de perfuração do meio de cultura [20], realizada com auxílio de cilindros de 6 mm de diâmetro para a formação de poços, e preenchimento dos espaços cilíndricos com 60 µl das soluções testes. Foram seguidas as recomendações propostas pela CLSI [21].

O inóculo foi preparado a partir de culturas de cepas bacterianas e fúngica replicadas em ágar Muller-Hinton e ágar Sabouraud dextrose, respectivamente. As culturas bacterianas foram mantidas a 37 °C, durante 24 h e a de fungo leveduriforme a 37 °C por 48 h. O inóculo para a realização do teste de perfuração em ágar foi diluído em solução salina 0,85 % estéril, obtendo-se uma turvação equivalente a 0,5 na escala de *MacFarland* ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Utilizou-se no controle positivo para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* o antibiótico ciprofloxacino (10 µg). Para *E. cloacae* foi utilizado cefepime (10 µg). No controle *A. baumannii* o antibiótico Meronem (10 µg), e para *C. albicans* o antifúngico Fluconazol (30 µg).

O antibiograma teve os halos de inibição mensurados com auxílio de um paquímetro considerando ativas as concentrações dos extratos que produziram halos de inibição contra os microrganismos iguais ou superiores a 10 mm diâmetro [22, 23, 24]. Os resultados foram expressos em milímetros e representa a média aritmética e desvio padrão do diâmetro dos halos de inibição das três repetições dos ensaios.

A determinação da concentração inibitória mínima dos extratos foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo CLSI [21], com as mesmas cepas utilizadas na técnica de difusão em ágar.

O teste de microdiluição foi realizado em microplaca, contendo 96 poços em formato de “U”. Foi utilizada uma microplaca para cada microrganismo testado. O inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml foi rediluído numa proporção de 1:10 (v/v) para obter a concentração padrão utilizada (10^4 UFC/ml) [25].

Os orifícios da microplaca foram preenchidos com 100 µl de caldo BHI duplamente concentrado [26]. A maior concentração da solução teste do extrato aquoso do gel de *A. vera* liofilizado 20 mg/ml foi obtida por diluição direta do extrato ao meio BHI. Assim, 0,4 g do material liofilizado foi diluído a 20 ml de caldo BHI e mantido em banho ultrassônico por 15 minutos para homogeneização. A solução foi filtrada em membrana PES (polietersulfona) com poro de 0,22 µm. O volume de 200 µl do extrato liofilizado foi adicionado à linha A da microplaca para iniciar a diluição seriada. O gel *in natura* 100 % filtrado foi diluído a 100 µl do caldo BHI na linha A, onde se obteve a concentração de 50 % como ponto de partida para as diluições da CIM.

Após a adição do extrato, alíquotas de 100 µl foram transferidas da linha A da microplaca sucessivamente e homogeneizadas ao caldo até a linha H, obtendo as diluições de 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/ml para o material liofilizado e 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 % para o material *in natura*. O volume final em cada poço da placa foi de 100 µl.

Para o controle positivo da viabilidade bacteriana e fúngica, utilizou-se o caldo BHI e o inóculo microbiano (5 µl) e para o controle de esterilidade, apenas o caldo [27].

Para controle positivo da inibição do crescimento do microrganismo utilizou-se para *P. aeuruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* o antibiótico ciprofloxacino dose seriada 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5 e 2,5 µg/ml. Para *E. cloacae* foi utilizado cefepime nas doses de 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5 e 2,5 µg/ml. No controle *A. baumannii* o antibiótico Meronem 320; 160; 80; 40; 20; 10, 5 e 2,5 µg/ml, e para *C. albicans* o antifúngico Fluconazol 480; 240; 120; 60; 30; 15; 7,5 e 3,75 µg/ml.

Após a micropipetagem, as placas foram incubadas a 37 ° C por 24 h, em repouso. Terminado o período de incubação, foram adicionados em cada orifício das placas 15 µl de resazurina a 1 % em solução aquosa esterilizada. Após 4h de incubação, foi realizada a leitura visual por observação colorimétrica do crescimento *trailing* [28].

A resazurina permite verificar qualitativamente a presença de crescimento microbiano. Enquanto a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, a cor rosa indica a presença de células viáveis em crescimento, o que possibilita determinar a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos em análise [28].

Os extratos que mostraram resultados em azul foram submetidos à nova cultura em Ágar Müeller-Hinton para as bactérias e Ágar Sabouraud para a cepa fúngica, a fim de avaliar viabilidade de crescimento bacteriano. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração na qual há inibição de crescimento, porém com crescimento positivo na subcultura e a Concentração Bacteriostática Mínima (CBM) foi determinada como a menor dose que visualmente apresentou inibição de crescimento e que na subcultura também não apresentou crescimento bacteriano [29].

2.4 Ensaio de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE)

O teste de FOE foi realizado com células vermelhas humanas incubadas com os extratos liofilizados (amostra A) e *in natura* (amostra B) da *A. vera* segundo método de Jain (1986) [30] com adaptações. Uma amostra de sangue foi incubada com NaCl a 0,9% como controle. As amostras foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, e então foi realizado a lavagem com NaCl a 0,9% para retirada do extrato por três vezes.

Alíquotas de 100 µl das células ressuspendidas (tratadas e controle) foram delicadamente adicionadas as soluções hipotônicas de NaCl (0,12 a 0,9%). Após 60 minutos de incubação a 37 ° C, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos e a densidade óptica dos sobrenadantes lidas a 540 nm em espectrofotômetro Gêneys 10S UV-VIS da Thermo Scientific.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA e posterior teste de Tukey. Foi utilizado para análise estatística o nível de significância de $p < 0,05$ utilizando para isto o software *GraphPad Prism* versão 6.0.

2.6 Revisão da literatura

As evidências científicas envolvendo a atividade antimicrobiana da *A. vera* frente a diferentes microrganismos foram obtidas mediante procedimento de pesquisa bibliográfica exploratória de bases de dados eletrônicas, tais como: Portal de Periódico Capes, SciELO, PubMed, Scopus, Embase e Medline, utilizando na estratégia de busca os descritores DeCS: *Aloe* e atividade antimicrobiana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à ampla utilização popular do gel da *A. vera* [5, 31, 32, 33, 34, 35] para o tratamento de lesões de pele, dentre elas, a queimaduras, optou-se por mimetizar a forma como a população faz uso do mesmo, mediante ensaios *in vitro*, a fim de verificar a atividade antimicrobiana e o potencial citotóxico do gel dessa planta.

Estudo de Paula e Cruz-Silva (2010) [36] investigou o conhecimento popular sobre o uso medicinal da *A. vera*, demonstra que é de censo comum que suas principais indicações terapêuticas são: atividade cicatrizante, antimicrobiana e seu uso em queimaduras. O estudo evidenciou ainda que a maneira como a população mais utiliza a planta, é em forma de cataplasma, ou ainda *in natura*, cortada ao meio sobre o ferimento [36].

A utilização de ervas medicinais pelos brasileiros tem na prática indígena suas bases, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular [37]. Na cidade de Palmas, foi observado o cultivo de plantas medicinais, dentre elas a *A. vera*, em locais destinados ao cultivo de hortaliças [38], o que mostra a influência cultural ainda presente nos hábitos da comunidade.

3.1 Ensaios de atividade antimicrobiana da *A. vera*

A ausência de padronização das metodologias de atividade antimicrobiana para extratos vegetais é fator limitante para as pesquisas. Sobretudo em relação à comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores [39].

As Tabelas 1 e 2 demonstram a resposta antimicrobiana da *A. vera* liofilizada e *in natura*, respectivamente, frente a microrganismos comumente envolvidos em infecção por queimaduras pelo método de difusão em ágar.

Tabela 1: Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm), obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato liofilizado de *Aloe vera*.

Microrganismos	Extrato da <i>A. vera</i> liofilizada					Controles	
	2,5mg/mL	5mg/mL	10mg/mL	15mg/mL	20mg/mL	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	47	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0*	0*	0*	0*	0*	23	0
<i>Enterococcus cloacae</i>	0*	0*	0*	0*	0*	22	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0*	0*	0*	0*	0*	20	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	32	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0*	0*	0	0	0	57	0
<i>Candida albicans</i>	0*	0*	0*	0*	0*	34	0

*Atividade de crescimento diferenciado ao redor do poço, embora não houvesse formação do halo.

Os resultados para o extrato aquoso do material liofilizado (Tabela 1) demonstram que dos sete microrganismos testados, nenhum apresentou halo de inibição do crescimento frente a *A. vera* em diferentes concentrações da planta.

Embora não tenha ocorrido a formação de halos inibitórios, em quatro microrganismos testados, observou-se um comportamento atípico das colônias ao redor do poço. Verificou-se em diferentes concentrações para *S. aureus*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *C. albicans* que as colônias apresentavam espaçamento entre si. Dois dos microrganismos não tiveram atividade observada, a *P. aeruginosa* e *E. coli* para o extrato aquoso do material liofilizado.

No que concerne à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar os resultados foram semelhantes aos encontrados por Nejjatzadeh-Barandozi (2013) [40] para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, em que não houve inibição de crescimento pelo método de extração em água. Entretanto, o estudo fez uso de outros extratores, etanol e acetona, que apresentaram zona de inibição. É proposto que a antraquinona e saponinas são apontados como responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Apesar de outros extratores terem sido utilizados e evidenciarem atividade antibacteriana, a extração em água foi o método escolhido por assemelhar-se ao uso popular frente às feridas por queimadura [5].

Tabela 2: Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm), obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato *in natura* de *Aloe vera*.

Microrganismos	<i>A. vera in natura</i>					Controles	
	20%	40%	60%	80%	100%	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	47	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0*	0*	0*	0*	0*	23	0
<i>Enterococcus cloacae</i>	0*	0*	0*	0*	0*	22	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0*	0*	0*	0*	0*	20	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	32	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0*	0*	0*	0*	0*	57,5	0
<i>Candida albicans</i>	0*	0*	0*	0*	0*	34	0

*Atividade de crescimento diferenciado ao redor do poço, embora não houvesse formação do halo.

Os resultados obtidos para o gel *in natura* (Tabela 2) foram semelhantes aos encontrados para o extrato do liofilizado. Atividade atípica com espaçamento entre colônias ao redor do poço, entretanto, sem formação de halo inibição para *S. aureus*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. As bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* não apresentaram halo de inibição, assim como não exibiram atividade atípica de crescimento frente a *Aloe vera in natura*.

Estudo realizado por Lawrence, Tripathi & Jeyakumar (2009) [41] corrobora para os dados deste estudo, ao afirmar que nenhuma atividade antimicrobiana foi relatada sob uso do extrato aquoso de *A. vera*, sendo tal fato explicado pela melhor extração dos compostos ativos através do etanol. Entretanto, é importante salientar que os compostos bioativos que possuam atividade antimicrobiana podem diferir na mesma espécie, a depender das condições de cultivo da planta.

A divergência de resultados para algumas espécies pode ainda ser justificada pela metodologia aplicada na obtenção do extrato que sugere possuir diferentes classes biossintéticas e químicas [42].

A atividade atípica identificada no teste de difusão em ágar instigou a realização de outro método para detecção de atividade antimicrobiana para o material liofilizado e *in natura*. Tendo em vista a maior sensibilidade, o método de microdiluição em caldo foi realizado para a investigação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguido do teste de Concentração Bacteriostática Mínima (CBM).

A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração testada dos extratos que apresentou capacidade de impedir o crescimento microbiano nas placas de microdiluição [43].

Tabela 3: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a *Aloe vera* liofilizada.

Microrganismos	CIM	CBM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05 mg/mL	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mg/mL	Bacteriostático
<i>Enterococcus cloacae</i>	10 mg/mL	Bacteriostático
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10 mg/mL	Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i>	10 mg/mL	Bacteriostático
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 mg/mL	Bacteriostático
<i>Candida albicans</i>	1,25 mg/mL	Bacteriostático

Contrapondo os resultados obtidos pelo método de diluição em ágar para a *A. vera* liofilizada, foi identificada atividade antimicrobiana por alteração colorimétrica pelo método de microdiluição para todos os microrganismos testados (Tabela 3). Tendo apresentado a melhor resposta frente a menor concentração a *C. albicans* (1,25 mg/ml). Denota-se, entretanto, que a atividade encontrada na CIM foi somente bacteriostática, visto que houve crescimento bacteriano no teste de CBM, conforme demonstra a Tabela 3.

Stanley, Ifeanyi e Eziokwu (2014) [44] obtiveram em seu estudo, resultados de inibição com método de microdiluição com baixas taxas de CIM para o extrato aquoso do gel da *A. vera* para *E. coli*, *S. aureus* (0,25 mg/ml) e *C. albicans* (0,5 mg/ml). Entretanto, resultados ainda melhores foram obtidos com o extrato etanólico testado com CIM de 0,125 mg/ml para *E. coli* e *S. aureus* e manutenção da taxa de 0,5 mg/ml para *C. albicans*.

Em estudo realizado por Goudarzi et al (2015) [45], estirpes de *P. aeruginosa* foram considerados sensíveis ao extrato de gel de *A. vera*, com CIM $\leq 400 \mu\text{g} / \text{mL}$. Além disso, os dados obtidos mostram uma boa atividade antibacteriana do extrato de gel de *A. vera* em diferentes concentrações contra *P. aeruginosa* isolado pacientes com queimaduras. Estes resultados podem ser atribuídos a diferenças no método de teste ou no processo de extração. Para o teste de microdiluição para a amostra *in natura*, *K. pneumoniae*, não evidenciou atividade frente as diferentes concentrações testadas.

Em contrapartida, todos os outros microrganismos testados demonstraram atividade bacteriostática, sendo a *C. albicans* o microrganismo com melhor resposta frente a menor concentração de *A. vera in natura* (3,12 %), conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a *Aloe vera in natura*.

Microrganismos	CIM	CBM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,50%	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i>	50%	Bacteriostático
<i>Enterococcus cloacae</i>	25%	Bacteriostático
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25%	Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i>	50%	Bacteriostático
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Candida albicans</i>	3,12%	Bacteriostático

(-) Não apresentou inibição.

Conforme demonstra a Tabela 5, a atividade antimicrobiana da *A. vera* já foi evidenciada por diversos estudos para uma coleção de microrganismos. Verifica-se a inibição por extrato aquoso para *S. aureus*, *E. coli*, *P. auriginosa*, *k. pneumoniae* entre outros microrganismos de importância clínica contrapondo e assentindo informações obtidas por este estudo [40, 41, 44, 46].

Tabela 5: Atividade antimicrobiana evidenciada pela *Aloe vera* frente a diversos microrganismos.

Microrganismo	Origem	Tipo de extrato	Autor
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado Clínico	Aquoso e etanólico	Stanley; Ifeanyi; Eziokwu (2014)
	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Nejatzadeh-Barandozi (2013)
	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
	MTCC 2943	Etanólico, metanólico e acetônico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Isolado Clínico	Aquoso, etanólico e acetônico	Nejatzadeh-Barandozi (2013)
	Isolado Clínico	Etanólico, aquoso e acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
	MTCC 442	Etanólico, metanólico e acetônico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	DMSO 2% Etanólico, metanólico e acetônico	Goudarzi et al. (2015)
	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Nejatzadeh-Barandozi (2013)
	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Pandey; Mishra (2010)
	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
	MTCC 1688	Etanólico e metanólico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Escherichia coli</i>	Isolado Clínico	Aquoso, etanólico e metanólico	Stanley; Ifeanyi; Eziokwu (2014)
	Isolado Clínico	Acetônico	Nejatzadeh-Barandozi (2013)
	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
	Isolado Clínico	Acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
	MTCC 1687	Etanólico, metanólico e acetônico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Candida albicans</i>	Isolado Clínico	Aquoso e etanólico	Stanley; Ifeanyi; Eziokwu (2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Isolado Clínico	Etanólico e acetônico	Arunkumar; Muthuselvam (2009)
<i>Enterococcus bovis</i>	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
<i>Proteus vulgaris</i>	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
<i>Proteus mirabilis</i>	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
<i>Morganella morganii</i>	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Isolado Clínico	Etanólico e aquoso	Pandey; Mishra (2010)
	MTCC 530	Etanólico, metanólico e acetônico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Bacillus cereus</i>	MTCC 1272	Etanólico, metanólico e acetônico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)
<i>Salmonella typhi</i>	MTCC 531	Etanólico e metanólico	Lawrence; Tripathi; Jeyakumar (2009)

3.2 Ensaios de FOE da *Aloe vera*

Alterações na membrana dos eritrócitos servem de ferramenta diagnóstica para doenças e para estudos de comportamento celular. Substâncias ingeridas ou que acessem o sistema vascular entram em contato com o tecido sanguíneo, podendo gerar efeitos deletérios aos eritrócitos [47].

Através da investigação da atividade tóxica pelo teste de FOE, não foi encontrada taxa de hemólise significativa que sugira efeito tóxico tanto para o gel da *A. vera* liofilizada (Figura 1) quanto para o gel *in natura* da planta (Figura 2) quando comparadas ao controle. Pela análise morfológica dos eritrócitos expostos a *A. vera*, também não foi verificado nenhuma alteração quando comparado com o grupo controle.

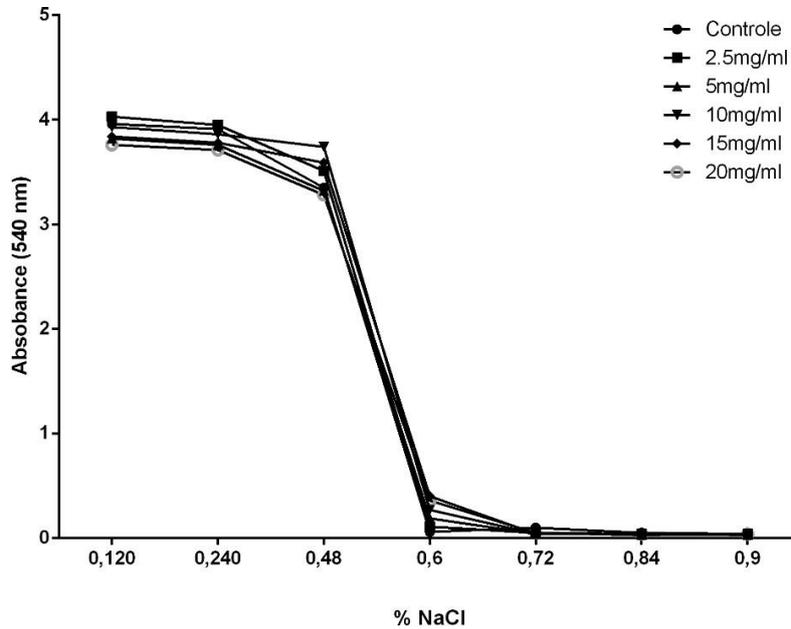


Figura 1: Curva de fragilidade osmótica eritrocitária para o gel de Aloe vera liofilizado

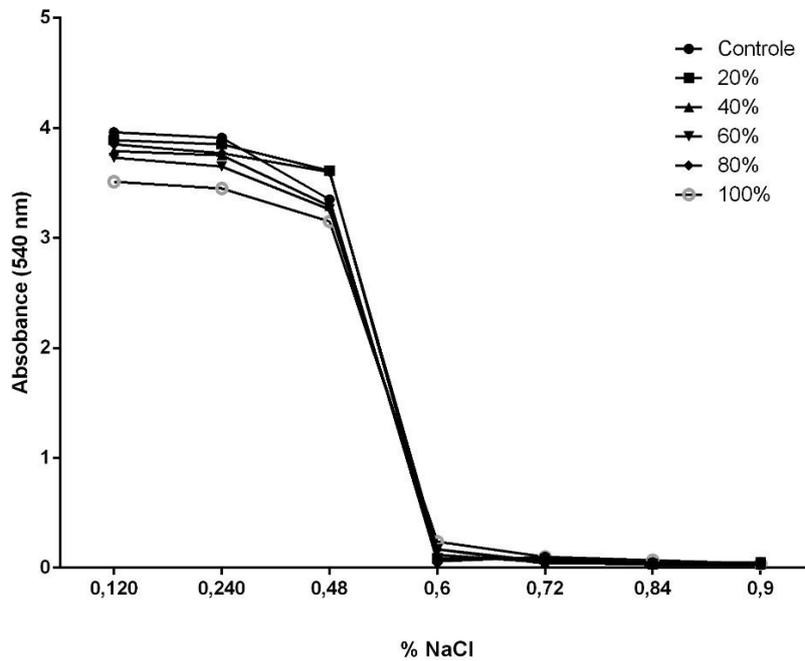


Figura 2: Curva de fragilidade osmótica eritrocitária para o gel de Aloe vera in natura

Sturbelle et al. (2010) [48] avaliaram que *A. vera* não demonstrou mutagenicidade indicando uma possível segurança de uso desta planta como fitoterápico, porém em alta dose (400ml/l) os mesmos autores encontraram atividade citotóxica.

Logo, apesar de nossos dados e da literatura atestarem a segurança de uso, recomenda-se que seu uso seja moderado, e ainda, deve ser levado em consideração o tempo de exposição, pois poucos são os testes de uso crônico desta planta [33, 35, 48, 49].

O uso da *A. vera* em feridas pode gerar acesso desta a corrente sanguínea, efeito simulado pelo teste *in vitro* de FOE. Tendo em vista, os resultados obtidos, sugere-se a segurança do uso pela população do gel *in natura* da planta em concentrações de até 20mg/ml.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a *Aloe vera* cultivada em Palmas - TO apresenta atividade antimicrobiana, de caráter bacteriostático na forma *in natura* e liofilizada para os microrganismos *S. aureus*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*. Quanto à citotoxicidade, não houve taxa de hemólise significativa pelo teste de fragilidade osmótica que evidenciasse risco tóxico. Logo, a *A. vera* testada neste estudo, pode ser utilizada em tratamento tópico de queimaduras de forma segura e com atividade bacteriostática para os principais microrganismos responsáveis por infecção em pacientes queimados.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a Universidade Federal do Tocantins. À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas VS, Rodrigues RAF, Gaspi FOG. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. F. Rev. Bras. Pl. Med. 2014;16(2):299-307.
2. Lorenzi H, Matos FJ Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum; 2008. 244p.
3. Palharin LHDC, Neto EF, Lopes MPC, Ascêncio F, Bosquê GG. Efeitos fitoterápicos e homeopáticos da babosa. Revista Científica Eletrônica de Agronomia; 2008. VII (14).
4. Foster M, Hunter D, Samman S. Evaluation of the nutritional and metabolic effects of *Aloe vera*. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.
5. Colet C, Portella GZ, Spanevello S, Neu D, Dalpiaz J, Petri A, Schwambachb K. Uso de *Aloe sp* no Município de Pejuçara – RS. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2015;17(2):119-23.
6. Ramos AP, Pimentel LC. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização. Braz. J. Health. 2011;2(1):40-48.
7. Leão CEG, Andrade ES, Fabrini DS, Oliveira RA, Machado GLB, Gontijo LC. Epidemiologia das queimaduras no estado Minas Gerais. Rev Bras Cir Plást. 2011;26(4):573-7.
8. Hosseinimehr SJ, Khorasani G, Azadbakht M, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A. Effect of Aloe Cream versus Silver Sulfadiazine for Healing Burn Wounds in Rats. Acta Dermatovenerol Croat. 2010;18(1):2-7.
9. Macedo JLS, Rosa SC, Macedo KCS, Castro C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. Rev Col Bras Cir, 2005;32(4):173-177.
10. Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Zamani A, Mahdavi MR. Aloe versus Silver Sulfadiazine Creams for Second-Degree Burns: A Randomized Controlled Study. Surg Today. 2009;39:587-591.
11. Rempel LCT, Tizzot MRPA, Vasco JFM. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. Rev Bras Queimaduras. 2011;10(1):3-9.
12. Gonella HA, Eamanach FE, Souza JC, Maluf MEZ. Análise da microbiota bacteriana colonizadora de lesões provocadas por queimaduras nas primeiras 24 horas. Rev Fac Ciênc Med Sorocaba. 2016;18(1):19-23.
13. Henrique DM, Silva LD, Costa ACR, Rezende APMB, Santos JAS, Menezes MM, Maurer TC. Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura. Rev Bras Queimaduras. 2013;12(4):230-4.
14. Oliveira FL, Serra MCVF. Infecções em queimaduras: revisão. Rev Bras Queimaduras. 2011;10(3):96-99.

15. Silveira PFD, Bandeira MA, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicas: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(4):618-626.
16. Vasconcelos J, Vieira JGP, Vieira EPP. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. *Rev Científica UFPA*. 2009;7(1).
17. WHO, World Health Organization. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva; 2004.
18. Santos HDS, Muratori MCS, Marques ALA, Alves VC, Cardoso Filho FDC, Costa APR, Rosa, CADR. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(1):50-60.
19. Miranda GS, Santana GS, Machado BB, Coelho FP, Carvalho CA. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Rev Bras Pl Med*. 2013;15(1):104-111.
20. Moody JO, Adebisi AO, Adeniyi BA. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the antimicrobial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? *J Ethnopharmacol*. 2004;92:57-60.
21. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Document M02-A11. Approved Standard – 11 ed. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
22. Aguiar JS, Costa MCCD, Nascimento SC, Sena KXFR. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(3):436-440.
23. Oliveira IS, Lima JCS, Silva RM, Martins DTO. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(4):587-593.
24. Camargo ER. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva mate) [Dissertação] Bragança Paulista (SP): Universidade de São Francisco, 2010. 87f.
25. Santos RFEP, Silva ISM, Veríssimo RCSS, Lúcio IML, Campesatto EA, Conserva LM et al. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras Plantas Med*. 2015;17(3):367-373.
26. Bordignon-Junior SE, Miyaoka MF, Costa JL, Benavente CAT, Couto GH, Soccol CR. Inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas em microdiluição por tratamento com Nisina e EDTA. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2012;3(4):127-35.
27. Almeida LFD, Cavalcanti, YW, Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Rev Bras Plantas Med*. 2012;14(4):649-655.
28. Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha W.R, Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quím Nova*. 2008;31(5):1224-1229.
29. Suffredini IB, Varella AD, Younes RN. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. *Rev Inst Ciênc Saúde*. 2007;25(2):131-2.
30. Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986. 1221p.
31. Gonçalves KG, Pasa MG. A etnocategoria medicinal e etnofarmacologia na comunidade Sucuri em Cuiabá – Mato Grosso. *Flovet – Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica*. 2015;1(7).
32. Silva MS, Antonioli AR, Batista JS, Mota CN. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta bot bras*. 2006;20(4):815-829.
33. Guo X, Mei N. *Aloe vera*: A review of toxicity and adverse clinical effects. *Journal of Environmental Science and Health*. 2016;34(2):77-96.
34. Sousa MJM, Moral FF, Nascimento GNL, Soares NP, Aversi-Ferreira TA. Medicinal plants used by Itamaraty community near by Anápolis, Goiás State, Brazil. *Acta Scientiarum Health Sciences*. 2010;32(2):177-184.
35. Verma A, Gupta AK, Kumar A, Khan PF. Cytogenetic toxicity of *Aloe vera* (a medicinal plant). *Drug and Chemical toxicology*. 2011;1-4.
36. Paula KBS, Cruz-Silva CTA. Formas de uso medicinal da babosa e camomila pela população urbana de Cascavel, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. 2010;32(2):169-176.
37. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa MDL. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto contexto – enferm*. 2006;15(1):115-121.
38. Gratão LHA, Rondelli GPH, Silva PVS, Souza GS, Schott E, Moreira RAM, Nascimento GNL. Análise situacional das hortas comunitárias do município de Palmas, Tocantins, Brasil: uma visão etnofarmacológica. *Revista Cereus*. 2015;7(2):22-42.
39. Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq Inst Biol*. 2014;81(3):218-225.

40. Nejatizadeh-Barandozi F. Antibacterial activities and antioxidant capacity of *Aloe vera*. *Org Med Chem Lett*. 2013;3(5):1-8.
41. Lawrence R, Tripathi P, Jeyakumar E. Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from *Aloe vera*. *Braz. J Microbiol*. 2009;40(4):906-915.
42. Junior PFS, Muniz EB, Pereira NA, Oliveira MAS. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2016;15(1):56-61.
43. Duarte MCT, Figueira, GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn*. 2004;14(S01):06-08.
44. Stanley M, Ifeanyi OE, Eziokwu OG. Antimicrobial effects of *Aloe vera* on some pathogens. *Int Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(3):1022-1028.
45. Goudarzi M, Fazeli M, Azad M, Seyedjavadi SS, Mousavi R. *Aloe vera* Gel: Effective Therapeutic Agent against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Burn Wound Infections. *Chemotherapy Research and Practice*. 2015;2015:1-5.
46. Pandey R, Mishra A. Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160:1356–1361.
47. Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas*. 2009;22(1):7-16.
48. Sturbelle RT, Pinho DS, Restani RG, Oliveira GR, Garcias GL, Martino-Roth MG. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Rev bras farmacogn*, 2010;20(3):409-415.
49. Xiaoqing G, Nan M. *Aloe vera*: A review of toxicity and adverse clinical effects. *J Environm Science and Health*. 2016;34:77-96.