

Manuela. P. Trindade ¹
Luiza Fonseca ²
Paulo José Lima Juiz ³

Antimicrobial activity of the dye from de bark of pomegranate (*Punica granatum*) on strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *in vitro* study

Abstract | Objective: Verify antimicrobial activity of ethanolic extract of Pomegranate (*Punica granatum*) to 20.0% against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Methodology: Serial dilutions were prepared in test tubes containing 2.0ml of distilled water, autoclaved, in order to obtain concentrations of 1:2 (tube 1) to 1:1024 (tube 10). For the sensitivity testing method was used a layered double medium, wich was added the inoculum suspension (10⁸ cells/ml) of indicator microorganisms (*S. aureus* and *S. pyogenes*). After solidification of the medium were made perforations and holes filled with rates of 25ul with experimental and control solution. The plates with *S. aureus* were wrapped in Kraft paper type, and *S. pyogenes* placed in an anaerobic jar (candle method) in an atmosphere of CO₂ in 24 hours. Results: The extract showed antimicrobial activity with measures of inhibition zone of 16mm for *S. aureus* and 15.5mm for *S. pyogenes* and diluted concentrations of 1:2, 1:4 and 1:8, respectively, for *S. aureus* 13mm, 12mm and 10mm; and for *S. pyogenes* 12mm, 10mm and 9mm. Conclusion: The extract of pomegranate (*Punica granatum*) to 20.0% and diluted to the concentration of 1:2 to 1:8, showed antimicrobial activity against the microorganisms.

Keywords | Medicinal plants; Antimicrobial activity; *Punica granatum*.

Atividade antimicrobiana da tintura da casca de romã (*Punica granatum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*: estudo *in vitro*

Resumo | Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana da tintura da casca do fruto da romã (*Punica granatum*) a 20,0%, em frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Metodologia: Foram preparadas diluições seriadas em tubos de ensaio, contendo 2,0ml de água destilada, autoclavada, em ordem para se obter concentrações de 1:2 (tubo 1) a 1:1024 (tubo 10). Para a prova de sensibilidade, foi utilizado o método de poço, optando-se pela confecção do meio de cultura por camadas duplas. Na segunda camada, foi adicionado ao meio a suspensão do inóculo (10⁸ células/ml) de microrganismos indicadores (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*). Após solidificação do meio, foram feitas perfurações e os orifícios preenchidos por alíquotas de 25µL com solução experimental e controle. As placas com *Staphylococcus aureus* foram embrulhadas em papel tipo Kraft e *Streptococcus pyogenes* e colocadas em jarra de anaerobiose (método de vela) em atmosfera de CO₂ por 24 horas. Resultados: A tintura da casca do fruto da romã a 20,0% apresentou atividade antimicrobiana com medidas de halo de inibição de 16mm para o *Staphylococcus aureus* e 15,5mm para *Streptococcus pyogenes* e, quando diluídos nas concentrações de 1:2, 1:4 e 1:8, respectivamente para *Staphylococcus aureus*, 13mm, 12mm, 10mm e *Streptococcus pyogenes*, 12mm, 10mm e 9mm. Conclusão: No estudo *in vitro*, a tintura do fruto da casca de romã (*Punica granatum*) a 20,0% e diluída na concentração de 1:2 a 1:8 mostrou atividade antimicrobiana em frente aos microrganismos Gram-positivos indicadores.

Palavras-chave | Plantas medicinais; Atividade antimicrobiana; *Punica granatum*.

¹ Cirurgiã-dentista - Salvador Bahia.

² Professora adjunta do Curso de Odontologia da FBDC-Bahia.

³ Professor da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Introdução |

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as plantas medicinais podem ser as melhores fontes para se obter uma variedade de drogas. Cerca de 80,0% de indivíduos em países desenvolvidos usam medicina tradicional que contém compostos derivados de plantas medicinais. De acordo com a Resolução do 3º Congresso da Federação Nacional dos Farmacêuticos, o Brasil é o 5º produtor mundial de medicamentos e 48,0% dessa produção encontram-se distribuídas para uma parcela de 15,0% da população com renda mensal acima de dez salários mínimos e apenas 16,0% da produção destina-se às necessidades de saúde dos 51,0% da população que têm renda abaixo de quatro salários⁸.

Além disso, o Brasil possui a mais rica flora em todo o mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, cerca de 20,0% da flora mundial. Estimativas indicam aproximadamente cinco a dez espécies de gimnosperma, 55.000 a 60.000 espécies de angiospermas, 3.100 espécies de briófitas e 1.200 a 1.300 espécies de pteridófitas, e em torno de 525 espécies de algas marinhas³. Essa biodiversidade pode ser uma rica fonte de matéria-prima de produtos naturais com atividade antimicrobiana e representa uma alternativa promissora no combate às cepas multirresistentes.

Efeitos adversos, incluindo dermatite temporária até choque anafilático, podem estar relacionados com o uso de plantas medicinais¹⁴. Portanto, a padronização, a fim de garantir a autenticidade da droga e a qualidade do fitoterápico, é fundamental.

Na comercialização popular das plantas medicinais, os cuidados quanto à identificação errônea das plantas, adulteração dos extratos, cápsulas, pó de planta acondicionado em saquinhos e garrafadas são relevantes¹³.

O uso de fitoterápicos tem sido mais estudado e divulgado na Medicina do que em outras áreas da saúde, como a Odontologia. Porém, é muito provável que muitas propriedades investigadas de caráter médico possam ser aplicadas na Odontologia⁷.

De acordo com o Manual Merck, as infecções estafilocócicas são aquelas causadas pelos estafilococos, Gram-positivos, encontrados no trato genital e respiratório superior. As infecções estreptocócicas são causadas por estreptococos Gram-positivos, podendo causar infecção estreptocócica da orofaringe e tonsilas. O *Streptococcus pyogenes* é responsável por várias

doenças, entre elas, a faringite. O *Staphylococcus aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e fossas nasais.

Scalabrin et al.¹⁰ estudaram a ocorrência de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite. Das 58 amostras, 55,2% foram provenientes de indivíduos atendidos em farmácias e 44,8% obtidas daqueles que procuraram as unidades de saúde. Dessas amostras 15 apresentaram cultura positiva para *S. pyogenes*, e 15,60% dos indivíduos foram atendidos em farmácia, muitas vezes sem orientação de um profissional especializado, podendo resultar na seleção de microrganismos resistentes em função do uso indiscriminado de antibióticos.

Segundo Catão et al.², o *Staphylococcus aureus* apresenta uma resistência significativa a penicilinas e ampicilinas e a outros grupos antimicrobianos e essa ocorrência é motivo de preocupação. Esse motivo fundamenta a utilização de plantas medicinais, como indicação para processo infeccioso, podendo constituir uma excelente forma de tratamento alternativo e coadjuvante, respaldada por pesquisas etnofarmacobotânicas.

Andreola e Goulart¹, pesquisando o *Streptococcus pyogenes* em pacientes com sintomas de faringite, encontraram, em cultura positiva para esse microrganismos, sensibilidade à Vancomicina e Eritromicina e resistência à Penicilina, Cefalotina e Clindamicina.

Nascimento et al.⁶ avaliaram a atividade microbiana de extratos vegetais e fitofármacos em frente a microrganismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais. Os resultados mostraram que o extrato da *Punica granatum* apresentou atividade antimicrobiana em pelo menos um microrganismo testado, como a *Pseudomonas aeruginosa*.

Pereira et al.⁸ estudaram a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca da romã (*Punica granatum* Linn) diante de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*. Os resultados mostraram que o extrato da Romã apresentou atividade em frente às linhagens bacterianas testadas, com formação do halo de inibição com medidas superiores a 15mm, resultado semelhante ao encontrado para clorexidina a 0,12%.

A *Punica granatum* (romã) da Família *Punicaceae* é uma planta ornamental e também considerada medicinal. A análise da atividade antimicrobiana para espécies *Punica granatum* mostra um potencial antimicrobiano

frente ao *Staphylococcus aureus*. Com propriedades antissépticas, é indicada para estomatites, faringites e laringites e é popularmente usada para rouquidão e inflamação da garganta¹¹.

Considerando a implicação do *S.aureus* e *S.pyogenes* em processos infecciosos da cavidade oral, como a faringite, e pelo uso da romã na medicina popular, os autores se propuseram a estudar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da tintura hidroalcoólica da casca do

fruto da romã (*Punica granatum*-20,0%) em frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

Material e método |

Amostra do extrato de *Punica granatum*

Para a realização do trabalho, foi utilizada como amostra a tintura da casca do fruto da romã a 20,0% (*Punica granatum*) com as seguintes especificações:

AVALIAÇÃO	RESULTADO
ASPECTO	Líquido de baixa viscosidade
COR	Castanho a castanho amarelado
ODOR	Característico
RESÍDUO SECO	Não há
PH	(5.0 +/- 1.0)
DENSIDADE	(0,900g/mL +/- 0,050)
SOLUBILIDADE	Solúvel em propilenoglicol, álcool e água, podendo ocorrer turbidez em contato com água e álcool
TEOR ALCOÓLICO	(60° GL +/- 10°)

Quadro 1 - Preparo da tintura hidroalcoólica da casca de romã

Para os procedimentos experimentais, eram preparadas, previamente, diluições na ordem de 1:2 a 1:1024 em tubos de ensaio (20x20mm) em duplicata da tintura hidroalcoólica da casca do fruto da romã (*Punica granatum*, 20,0%). De um tubo com 10,0ml da solução experimental (*Punica granatum* a 20,0%) foi retirado 1,0ml e adicionada ao tubo 1, contendo 2,0ml de água destilada para o início das diluições e em ordem para se obter concentrações de 1:2 até 1:1024.

Preparo do inóculo bacteriano

Cepas de *Streptococcus pyogenes* e de *Staphylococcus aureus* doadas pelo Laboratório da Microbiologia da Odontologia da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências foram utilizadas como indicadores para a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* a 20,0%.

Em relação ao inóculo, foram realizadas diluições de 10^{-1} até 10^{-5} . Observou-se que a diluição 10^{-4} correspondia ao padrão 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/ml) da escala de MCFARLAND.

Dessa forma, os microrganismos indicadores (*S.aureus* e *S.pyogenes*) foram ativados em tubos com 5,0ml de caldo BHI (em duplicata) e incubados a 37°C por 24 horas. Durante esse período, foi observado o cresci-

mento por turvação do meio. A seguir, foi retirado 1,0ml do inóculo e adicionado ao tubo A (10^{-1}) que continha 9,0ml de caldo BHI previamente preparado e autoclavado. Em seguida, foram iniciadas as diluições subsequentes na ordem 10^{-1} a 10^{-4} , com a finalidade de atingir a escala padrão 0,5 de McFarland com a proporção aproximada de $1,5 \times 10^8$ de células por ml. As diluições foram feitas com cada microrganismo e em duplicata.

Teste de atividade antimicrobiana (Técnica da Difusão em Agar – técnica do “poço”)

Para o teste de atividade antimicrobiana, foi utilizado o “método do poço”. Por isso, optou-se pela confecção de um meio de cultura com camadas duplas.

A) Camada base:- 10,0ml dos meios de cultura ágar Muller Hinton e ágar BHI foram preparados e autoclavados a 121°C por 20 minutos em tubos de ensaio. Ao adquirir a temperatura de mais ou menos 50°C, os meios contidos nos tubos foram vertidos em placa de Petri (20x100mm). Após a solidificação do meio, as placas foram pré-incubadas a 37°C por 24 horas, para avaliação da contaminação do meio.

B) Camada dupla: 10,0ml do meio de cultura foram

preparados e autoclavados a 121°C por 20 minutos em tubos de ensaio. Ao adquirir a temperatura de mais ou menos 50°C, foi adicionado 1ml do inóculo contendo o microrganismo a ser estudado de modo que a concentração final de microrganismos no meio de cultura fosse de 10⁸ células/ml. Foi usado ágar Muller Hinton para o *S.aureus* e ágar BHI para *S. pyogenes*. A solução final era homogeneizada em um mixer e vertida sobre a camada-base (A) já solidificada na placa.

Após solidificação do meio de cultura, foram realizadas perfurações, utilizando-se um anel confeccionado com matriz de aço inoxidável com diâmetro de 5mm, devidamente autoclavado. Essas perfurações foram chamadas de poços e foram preenchidas com

25uL das soluções de *Punica granatum* em suas diversas concentrações (1:2 a 1:1024) e soluções controle C₀ – amostra da *Punica* (20,0%); CP- clorexidina (Periogard- 0.12%) CA – etanol (60° GL), com auxílio de uma pipeta automatizada.

As placas foram mantidas fechadas em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas e após, incubadas a 37° C por 24 horas.

As placas que continham as amostras de *Streptococcus pyogenes* foram colocadas em jarra de anaerobiose, em uma atmosfera de CO₂ (técnica da vela acesa). As placas com amostras de *Staphylococcus aureus* foram embrulhadas em papel Kraft e incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas.

Concentração (mg/mL)	<i>S.aureus</i>	<i>S.pyogenes</i>
	Medida do Halo de inibição (mm)	Medida do Halo de inibição (mm)
1:2	13mm	12mm
1:4	12mm	10mm
1:8	10mm	9mm
1:16 a 1:1024	zero	zero
C0	16mm	15,5mm
CP	20mm	24mm
CA	zero	zero

Quadro 2 -Teste de atividade antimicrobiana –difusão em agar (técnica do “poço”) com medida do halo de inibição (mm), da tintura hidroalcoólica da casca do fruto da romã em frente ao *S.aureus* e *S.pyogenes*. Grupo controle: C0=*Punica granatum* a 20,0%, CP=clorexidina 0,12% e CA= etanol 60° GL

Resultados |

O Quadro 2 indica que o *S.aureus* mostrou sensibilidade positiva à tintura hidroalcoólica da casca do fruto da romã, apresentando medidas de halo de inibição nas concentrações de 1:2 (13mm), 1:4 (12mm), 1:8 (10mm). O *S.pyogenes* mostrou sensibilidade positiva nas concentrações de 1:2 (12mm), 1:4 (10mm), 1:8 (9mm). Para o grupo controle, o *S.aureus* mostrou sensibilidade positiva C0 (16mm), CP (20mm) e para o *S.pyogenes*, C0 (15,5mm) e CP (24mm). Ambos os microrganismos não apresentaram sensibilidade ao etanol a 60° GL.

Discussão |

Produtos de origem vegetal têm mostrado sua potencialidade no que se refere à sua atividade antimicrobiana sobre uma diversidade de microrganismos. Dentre eles, a *Punica granatum* conhecida popularmente como romã, com propriedades medicinais, como antisséptico bucal e adstringente, é indicada para estomatites e faringites.

A *Punica granatum* vem sendo estudada em frente a microrganismos multirresistentes de importância médica e também sendo utilizada na comercialização popular. Segundo Menezes et al.⁴, a romã se mostra efetiva na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, especificamente de *S.aureus*, agente etiológico de diversas doenças que vem apresentando um aumento significativo de resistência aos antibióticos convencionais.

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e fossas nasais.

Considerando a atividade antimicrobiana da tintura hidroalcoólica da casca do fruto da romã (*Punica granatum* a 20,0%), os resultados expostos no Quadro 1 mostram que o *S.aureus* apresentou sensibilidade ao extrato da casca de romã (*Punica granatum*) nas concentrações de 1:2(13mm), 1:4(12mm), 1:8(8mm). O grupo controle C0 (extrato de *Punica granatum*-20%) apresentou halo de inibição com diâmetro de 15,5mm e CP (clorexidina 0,2%) com 24mm.

Esses achados se aproximam com os dados relata-

dos por Silva et al.¹², quando mostram o extrato de *P.granatum* com ação antimicrobiana sobre as linhagens ensaiadas formando halo de inibição entre 10 a 36mm de diâmetro, confirmando a ação antimicrobiana do extrato de *P.granatum* em frente a *Staphylococcus aureus*. Assim como para Catão et al.², que avaliaram amostras de *S.aureus* com diferentes concentrações do extrato etanólico de *P.granatum*, observando que todas as 17 (100,0%) cepas apresentaram sensibilidade ao extrato na concentração de 10,0% que decaía à medida que aumentava a diluição do extrato. Mostrou-se que as medidas do halo de inibição de crescimento bacteriano variaram bastante, sendo o menor igual a 8,0mm e o maior igual a 30,0mm.

Os dados encontrados por Catão et al.² corroboram os resultados observados no estudo, no que se refere à medida do halo de inibição (mm) e diluição do extrato. Pereira et al.⁹ encontraram resultados de 2mm(1:2) e 1mm (1.4) nas diluições seriadas (1:2 a 1:32) do extrato da casca de romã em frente a *S.aureus*.

Em relação ao grupo controle, observa-se que a o extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* a 20,0% apresentou o halo de inibição de 16mm, próximo ao diâmetro de 20mm apresentado pelo controle positivo (clorexidina a 0,12%) mostrando assim o potencial dessa concentração em frente ao *S.aureus*.

Os resultados indicados no Quadro 1 mostram que os *S.pyogenes* apresentaram sensibilidade ao extrato da casca de romã (*Punica granatum*) nas concentrações de 1:2(12mm), 1:4(9mm), 1:8(9mm). O grupo controle C0 (extrato de *Punica granatum*-20%) apresentou halo de inibição com diâmetro de 15,5mm e CP (clorexidina 0,12%) com 24mm.

A sensibilidade do *S.pyogenes* em frente a o extrato hidroalcoólico da casca da romã (*Punica granatum*) também decaiu à medida que aumentava a diluição.

O etanol 60° GL (controle CA) mostrou resultado igual a zero tanto para o *S.aureus* como para *S.pyogenes*. De acordo com a análise físico-química da tintura da casca do fruto da romã a 20,0% (*Punica granatum*), o teor alcoólico usado para solubilidade da tintura foi de 60° GL +/-10° . Com esse resultado, podemos afirmar que não houve influência do etanol a 60° GL na atividade antimicrobiana da tintura da romã em frente ao *S.aureus* e *S.pyogenes*.

Pelo visto no Quadro 2, os dados CO (controle-tintura da casca do fruto de romã (*Punica granatum* a

20,0%) apresentaram halo de inibição com medidas de 16mm e 15,5mm, em frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Esse é um resultado considerado importante por demonstrar que nessa concentração o extrato da casca de romã apresenta atividade antibacteriana, em frente aos microrganismos Gram-positivos testados, sobretudo porque o extrato pode ser facilmente adquirido no comércio, como tratamento para faringite.

De acordo com Nascimento et al.⁵, no Brasil, além do comércio tradicional dos ervaes, são comercializados livremente, em farmácia, drogarias e supermercados, produtos industrializados à base de plantas, cujo consumo tem sido estimulado nos últimos anos. Existe uma carência de estudos científicos sobre a atividade terapêutica e efeitos adversos da maior parte desses produtos, não havendo, portanto, uma preocupação com a eficácia e o uso seguro.

Cabe ressaltar que o diagnóstico preciso e o tratamento adequado, sem a prescrição desnecessária de agentes antimicrobianos, é fundamental para prevenir o surgimento de cepas multirresistentes¹¹.

Conclusão |

Os resultados encontrados permitem concluir que a tintura da casca do fruto de romã (*Punica granatum*), em estudo *in vitro*, apresentou atividade em frente ao *S.aureus* e *S.pyogenes* na concentração de 20,0% e, quando diluída, na concentração de 1:2;1:4 e 1:8.

Referências |

1. Andreola E, Goulart LS. Perfil de susceptibilidade de *Streptococcus pyogenes* isolados de pacientes com faringite. *Pharmacia Brasileira* 2007; 19:160-4.
2. Catão RMR. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *RBAC* 2006; 38(2):111.
3. Giulietti AM, Harley RM, Paganucci L et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology* 2005; 19(3): 632-9.
4. Menezes S.M.S et al. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L.(romã). *Revista Brasileira de Medicina* 2008; 65(11):388-91.

5. Nascimento JE et al . Produtos à base de plantas medicinais comercializados em Pernambuco-Nordeste do Brasil, Acta.Farm Bonaerense 2005; 24(1):113-22.
6. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. J Bras Microbiol 2000; 31(4): 247-56.
7. Perazzo FF, Silva RS, Carvalho JCT, Groppo FC. Utilization de substancias naturales em Odontologia, JBF 2004; 2(14):9-15.
8. Pereira, J; Silva, Severino da; Filho, Lauro; Higino L.J. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum linn* sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. Periodontia 2001 12(4): 57-64.
9. Pereira MSM et al. Atividade antimicrobiana dos extratos de plantas no semi-árido Paraibano. Agropecuaria Científica 2006; 2(1): 37-43
10. Scalabrin R, Buss GD, Iamaguchi KCS, Cardoso CL, Garcia LB. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Revista Bras Otorrinolaringol 2003; 69: 814-8.
11. Silva RC. Plantas medicinais na saúde bucal. Ministério da Cultura, Vitória-ES; 2001.
12. Silva MAR et al. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn-over bovine strain of *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Farmacogn 2008; 18(2): 209-12.
13. Tripathi SM, Singh DK, Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. Braz J Med Biol Res 2000; 33(11):1351-5.
14. Veiga Júnior VF, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nova 2005; 28(3):519-28.

Recebimento: 22-9-09 | Aceite: 16-11-09

Correspondência para/ Reprint request to:

Luiza Fonseca

Rua Santa Berenice 49 apto 302

Praia da Costa

Vila Velha, ES 29101-070

Tel.: (27) 3349-8907

fonscaluiz@a@terra.com.br