

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO GLICÓLICO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) SOBRE *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* E *Candida* spp.

Jonatas Rafael de Oliveira, Vinícius Carlos de Castro, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Cláudio Antonio Talge Carvalho, Rosilene Fernandes da Rocha, Antonio Olavo Cardoso Jorge, Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista – UNESP / Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Avenida Eng. Francisco José Longo, 777 – São José dos Campos, jroliveira16@hotmail.com.

Resumo - Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *P. granatum* L. (romã) sob cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Para tanto, foi aplicado o teste de microdiluição em caldo de acordo com NCCLS. Após determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram semeados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) ou Sabouraud-dextrose a CIM, uma concentração acima e uma abaixo para constatação da Concentração Microbicida Mínima (CMM). As concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,13 mg/mL foram efetivas para as espécies avaliadas, contudo, a CMM₅₀ para *S. aureus* foi 12,5 mg/mL, para *S. epidermidis* e *S. mutans* foi 6,25 mg/mL e para *Candida* spp. foi 25 mg/mL. A CMM efetiva para todas as cepas foi determinada sob a concentração de 50 mg/mL. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o extrato de romã apresentou importante atividade microbicida para as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Palavras-chave: *P. granatum*, romã, antimicrobiano.

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

P. granatum L., conhecida no Brasil como romã, pertence à família Punicaceae. As pequenas árvores produtoras de romã são de origem mediterrânea (NEGI; JAYPRAKASHA, 2003), no entanto, podem ser encontradas no sudoeste asiático, nas Américas e em outras partes do mundo (BRAGA et al., 2005; VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2005).

Este vegetal além de apresentar atividade antimicrobiana contra diversas espécies de microrganismos, também teve descrita sua ação antioxidante, anti-tumoral e anti-inflamatória (JURENKA, 2008; BIALONSKA et al., 2009). Jurenka (2008) descreveu ainda que diversos compostos da romã vem sendo utilizadas no tratamento e prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e odontológicas, bem como, diabetes, disfunção erétil e infecções bacterianas causadas por cepas resistentes a antibióticos. Estudos comprovaram que a casca da romã apresentou efetividade no tratamento de diarreia, disenteria (CHOPRA et al., 1992) e também no tratamento de malária, pelo seu efeito antiplasmódico (DELL'AGLI et al., 2009).

O surgimento de patógenos antibiótico-reistentes tem proporcionado à comunidade científica a oportunidade de buscar componentes de origem natural, como os das plantas, para o controle de tais microrganismos. Em relação à

romã, o que tem sido relatado na literatura são os polifenóis, taninos e flavonóides com ampla capacidade antimicrobiana (MACHADO et al., 2003; NAZ et al., 2007).

Diversos estudos tem sido conduzidos referentes à verificação de atividades biológicas de plantas medicinais, tais como, atividade antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória, anti-tumoral, dentre outras aplicações. Com isso, é possível perceber que tem aumentado a busca por métodos alternativos quem possam promover o controle de doenças, respondendo positivamente com um tratamento efetivo ao paciente, uma vez que, se espera que não ocorram efeitos indesejáveis, ou caso surjam, sejam minimizados. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *P. granatum* L. (romã) em cepas-padrão (ATCC) e em cepas clínicas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, conforme protocolo 008/2010-PA/CEP.

O extrato glicólico de *P. granatum* L. (romã) foi preparado na concentração de 200 mg/mL, a partir

de pó seco adquirido comercialmente na empresa Oficina de Ervas (Ribeirão Preto, SP).

A ação do extrato de romã foi avaliada sob nove cepas clínicas e uma cepa-padrão de *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. mutans* (ATCC 35688), *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. glabrata* (ATCC 90030), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, totalizando 60 cepas testadas.

Os inóculos foram preparados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), sendo ajustada sua turbidez de acordo com a escala de McFarland de 0,5 para obtenção da concentração de 5×10^5 células/mL, para as bactérias, e de $2,5 \times 10^3$ células/mL, para as leveduras. Para esta finalidade, as cepas bacterianas foram cultivadas em ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia) e as fúngicas em ágar Sabouraud-dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) pelo período de 24 horas a 37°C, sob condições de microaerofilia (5% de CO₂) para as cepas de *S. mutans*.

Para determinação da CIM foi realizado o teste de microdiluição em caldo (NCCLS 2002; 2003), para tanto, foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis com tampa (TPP, Suíça). Entre as colunas 1 e 10 da microplaca foram feitas 10 diluições seriadas do extrato de romã em meio de cultura, sendo caldo Mueller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias e RPMI 1640

(Himedia, Mumbai, Índia) para as leveduras. As concentrações obtidas foram 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 mg/mL. Após a diluição do extrato, foram inoculados em cada poço 5 µL da suspensão bacteriana ou 100 µL da suspensão de leveduras, mantendo um poço para controle positivo (meio de cultura + inóculo) e outro para controle negativo (meio de cultura), o teste foi feito em duplicata. As microplacas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 h, respeitando as condições de microaerofilia para *S. mutans*.

Após, foi realizada análise macroscópica dos poços e a CIM foi determinada no poço sem turvação, no entanto, para determinação da CMM foram semeados 100 µL da CIM, de uma concentração acima e de uma abaixo, em placas de ágar BHI ou Sabouraud-dextrose. Após 48 h foram determinadas a CMM do extrato de romã nas placas que não apresentaram crescimento de colônias.

Os dados obtidos foram analisados quanto ao percentual de eliminação de cepas em relação a cada concentração do extrato de romã.

Resultados

Dentre as dez concentrações testadas, seis foram efetivas para as cepas microbianas avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato glicólico de *P. granatum* L. (romã)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10	10	10*	7	2	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	10	10	8*	5	4	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	10	10	10	9	3*	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10*	7	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10	8*	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10	6*	1	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; *CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

Para que ocorresse eliminação de todas as cepas das seis espécies de microrganismos foi necessário a utilização da concentração de 50 mg/mL, no entanto, a CMM₅₀ para *S. aureus* foi determinada em 12,5 mg/mL, para *S. epidermidis* e *S. mutans* a 6,25 mg/mL e para as cepas de *Candida* spp. foi 25 mg/mL.

Discussão

O presente estudo buscou verificar a efetividade do extrato de romã não somente em cepas-padrão, mas também em isolados clínicos, uma vez que, é possível haver diferenças no comportamento de microrganismos da mesma espécie isolados de pacientes distintos, em

relação à susceptibilidade a antimicrobianos, como demonstrado por Michelin et al. (2005), que constataram diferenças comportamentais entre cepas-padrão e cepas nosocomiais de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, quanto a sensibilidade a extratos naturais.

Cepas de *S. epidermidis* e *S. mutans* demonstraram maior sensibilidade ao extrato de romã, uma vez que a CMM₅₀ para ambas as espécies foram 6,25 mg/mL. Com isso, no caso de *S. mutans*, pode-se pensar no desenvolvimento de produtos, com princípios ativos de romã, no intuito de combater cárie dental, uma vez que, esta espécie seja uma das responsáveis por esta infecção (PEREIRA et al., 2006) e para *S. epidermidis*, com atuação no controle da formação de biofilme, um de seus principais fatores de virulência, que podem afetar pessoas recém-implantadas (AN; FRIEDMAN, 2000).

O extrato de romã apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas avaliadas neste estudo, no entanto, observou-se comportamento distinto entre cepas bacterianas e fúngicas. Levando em consideração a eliminação de 100% dos isolados, a ação fungicida do extrato de romã ocorreu em concentração superior à determinada em cepas bacterianas, isto é, a 50 mg/mL, uma vez que, o efeito bactericida do extrato foi determinado na concentração de 25 mg/mL. Este comportamento também foi observado por Michelin et al. (2005), onde verificaram melhor efetividade do extrato de romã sob *S. aureus* que *C. albicans*.

Segundo Voravuthikunchai et al. (2005) a ação antimicrobiana da romã se deve a presença do composto fenólico tanino e para Machado et al. (2002), além deste composto há também a punicalagina com comprovada atividade antimicrobiana. Machado et al. (2003) e Naz et al. (2007) explicaram que os microrganismos são afetados pelo tanino através de uma reação específica que ocorre entre este composto e o sulfidril, um componente presente em proteínas.

A obtenção de diferentes produtos da romã com propriedades biológicas tem demonstrado forte potencial antimicrobiano, frente a diversas espécies de microrganismos. Al-zoreky (2009), verificou que o extrato da casca da fruta produziu inibição de cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), demonstrando desta forma, uma maneira alternativa para controle deste microrganismo que pode causar sérias infecções, além de ser seletivo para o antimicrobiano metilina. Braga et al. (2005), constataram que o extrato de romã além de inibir MRSA também foi eficiente na inibição de enterotoxinas produzidas por esta espécie, segundo os autores, MRSA são equipados com genes para diversas enterotoxinas. Pereira et al. (2006) comprovaram que o extrato

da casca do fruto da romã afetou a formação de biofilmes de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*, causadores de cárie dental, através da inibição da aderência destas bactérias quando o extrato interferiu na produção de componentes do biofilme, como as adesinas, por exemplo. Hayouni et al. (2011) constataram que o extrato de sementes de romã, apresentou atividade antimicrobiana contra diversas espécies de microrganismos, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella anatum*, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae*; *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichopyton rubrum* e *Aspergillus niger*.

Diante do surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos, torna-se relevante o aprimoramento de estudos com plantas medicinais com forte potencial microbicida, como forma alternativa de controle de infecções. No entanto, a verificação de componentes tóxicos para seres humanos também devem ser conduzidos, a fim de se obter produtos efetivos contra microrganismos patogênicos e viáveis quanto à utilização clínica.

Conclusão

O extrato glicólico de *P. granatum* L. (romã) apresentou importante atividade microbicida para as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Referências

- AL-ZOREY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **Int J Food Microbiol.** V.134, p.244-8, 2009.
- AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications. Totowa: Humana Press Inc, 2000.
- BIALONSKA, D.; KASIMSETTY, S.G; SCHRADER, K.K.; FERREIRA, D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. **J Agric Food Chem.** V.57, p.8344–9, 2009.
- BRAGA, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J.A.; CARMO, L.S., et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **J Ethnopharmacol.** V.96, p.355-9, 2005.
- CHOPRA, R.N.; NAYER, S.L.; CHOPRA, I.C. **Glossary of Indian Medicinal Plants.** 3ed. India: Council of Scientific and Industrial Research, 1992.

- DELL'AGLI, M.; GALLI, G.V.; CORBETT, Y.; TARAMELLIB, D.; LUCANTONIC, L.; HABLUETZEL, A. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. **J Ethnopharmacol.** V.125, p.279–85, 2009.
- HAYOUNI, E.A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H., et al. Hydroalcoholic extract based ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine.** In press 2011.
- JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. **Altern Med Rev.** V.13, p.128-44, 2008.
- MACHADO, T.; PINTO, A.; PINTO, M.; LEAL, I.; SILVA, M.; AMARAL, A., et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob Agents.** V.21, p.279–284, 2003.
- MACHADO, T.B.; LEAL, I.C.R.; AMARAL, A.C.F.; SANTOS, K.R.N.; SILVA, M.G.; KUSTER, R.M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **J Braz Chem Soc.** V.13, p.606-10, 2002.
- MICHELIN, D.C.; MORESCHI, A.C.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn.** V.15, p.316-20, 2005.
- NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S.; SAYEED, S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **Int J Food Sci Nutr.** V.72, p.341–5, 2007.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6th ed. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, USA, 2003.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2. ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Estados Unidos, 2002.
- NEGI, O.S.; JAYAPRAKASHA, G.K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. **J Food Sci.** V.68, p.1473-7, 2003.
- PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; SAMPAIO, F.C.; SAMPAIO, M.C.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F.; HIGINO, J.S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev Bras Farmacogn.** V.16, p.88-93, 2006.
- VORAVUTHIKUNCHAI, S.; SRIRIRAK, T.; LIMSUWAN, S.; SUPAWITA, T.; IIDA, T.; HONDA, T. Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **J Health Sci.** V.51, p.590–6, 2005.