

Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo *in vitro* e *in vivo*

Effect of pomegranate extract (*Punica granatum*) on cariogenic bacteria: *in vitro* and *in vivo* study

João Antônio Argenta¹, Moacir Pasqual², Cássio Vicente Pereira³, Disney Ribeiro Dias⁴, Ricardo Augusto Barbosa³, Luciano José Pereira⁵

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inibitório de extratos de plantas sobre cepas de *Streptococcus mutans in vitro* e avaliar *in vivo* o potencial inibitório de dentifrício incorporado com o extrato de maior potencial sobre estreptococos do grupo mutans e sobre o índice de biofilme. **Materiais e Métodos:** Em meio de cultura inoculado com *S. mutans* (ATCC25175), depositaram-se extratos etanólicos de 32 plantas. Posteriormente, avaliaram-se os halos de inibição. As capacidades inibitórias foram: *Ocimum gratissimum* (flor) com 08 mm; *Moringa oleífera* (folha) 10 mm; *Copaifera langsdorffi* (folha) 16 mm e *Punica granatum* (pericarpo desidratado) com 18 mm. Uma vez que este último extrato apresentou o maior halo de inibição, foi utilizado na fase seguinte. O extrato de romã (*Punica granatum*) foi incorporado em dentifrício, nas concentrações de 1% e 3% após determinação da concentração inibitória mínima. Estes foram testados em 30 voluntários divididos em 3 grupos (um para cada extrato e um grupo controle). Os voluntários fizeram uso dos dentifrícios durante 08 dias. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação do índice de biofilme e contagem de estreptococos do grupo mutans (UFC/ml). **Resultados:** Houve redução ($p < 0,05$) no índice de biofilme para o extrato a 3%, porém não houve diferença na contagem de microrganismos ($p > 0,05$). **Conclusão:** Conclui-se que a *Punica granatum* L. foi o extrato que apresentou maior atividade inibitória *in vitro* contra *S. mutans*. A formulação do dentifrício mostrou eficiência após oito dias de uso diminuindo significativamente o índice de biofilme, porém, não apresentou redução do número de estreptococos do grupo mutans.

Descritores: Produtos com ação antimicrobiana. *Punica granatum*. Biofilmes. Dentifrícios. *Streptococcus mutans*. Cárie dentária.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária decorrente da ação de bactérias acidogênicas e acidúricas presentes no biofilme, sendo uma das mais relevantes e frequentes doenças bucais nas populações. Pesquisas com produtos naturais, obtidos a partir de extratos de plantas medicinais sob a forma de enxaguatórios e cremes dentais, têm sido realizadas, visando o controle de microrganismos presentes no biofilme dentário^{1,2}, bem como em inúmeras situações ligadas a odontologia³⁻⁸. Vários grupos microbianos, como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Neisserias*, *Bacteroides*, *Treponema* e *Mycoplasma* compõem a microbiota bucal. Os estreptococos do grupo mutans, especialmente *S. mutans* e *S. sobrinus*, destacam-se como espécies microbianas

mais importantes, pela sua íntima relação com os processos de iniciação e desenvolvimento da cárie^{9,10}, a partir da produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares resultantes da hidrólise de sacarose^{11,12}. Outras bactérias como espécies de lactobacilos, estão envolvidas especialmente ao processo de desenvolvimento da cárie, por não apresentarem o aparato enzimático para síntese de glucanos de alto peso molecular que facilitam a adesão à superfície lisa do esmalte. Desta forma, estes microrganismos são mais correlacionados a progressão de lesões já cavitárias ou regiões de fôssulas e fissuras que apresentam retenção mecânica.

A ocorrência de cárie é determinada pela relação microrganismo/hospedeiro que pode ser alterada por vários fatores ambientais. A remoção

¹Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil

³Curso de Odontologia, Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), Lavras, MG, Brasil

⁴Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil

⁵Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil

Contato: argenta@unilavras.edu.br, mpasqual@dag.ufla.br, cassio@unilavras.edu.br, diasdr@dca.ufla.br, rabarbosa@unilavras.edu.br, lucianojosepereira@dmv.ufla.br

mecânica, o controle químico e mudanças de hábitos como a redução da frequência do consumo de açúcares podem contribuir para um equilíbrio ecológico do biofilme reduzindo o potencial cariogênico do mesmo¹⁰. As principais substâncias químicas empregadas são os antibióticos, enzimas, antissépticos e fluoretos. No entanto, a aplicação tópica de antibióticos sobre o biofilme dentário leva a resistência dos microrganismos, produzindo um desequilíbrio, o que impossibilita sua utilização contínua como recurso preventivo das doenças periodontais e cárie¹³. A clorexidina é o antisséptico mais utilizado para prevenir o acúmulo de biofilme. Porém pode causar gosto metálico na boca, provocar náuseas e vômitos, dores abdominais, hipersalivação e até mesmo genotoxicidade¹⁴⁻¹⁶.

O problema da resistência de patógenos humanos a múltiplas drogas é bem conhecido atualmente, sendo que a procura de novos antibióticos a partir de espécies vegetais é uma das medidas sugeridas para a busca de soluções. Extratos e óleos essenciais de várias espécies de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de microrganismos relacionados a infecções da pele, de bactérias patogênicas bucais¹⁷, e de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de biofilmes dentais¹⁸. O uso de extratos vegetais apresenta como vantagem o baixo custo envolvido na sua preparação¹⁹. O efeito antimicrobiano dos extratos de plantas medicinais pode ser um campo promissor para a utilização destas substâncias no tratamento alternativo da cárie dentária e do controle do biofilme dentário, e o estudo destes fitoterápicos poderá ampliar sobremaneira os conhecimentos dessa área de interesse.

Tendo em vista a possível ação antibacteriana de extratos de plantas medicinais e sua incorporação em cremes dentais, propôs-se este estudo, com o objetivo de investigar preliminarmente o efeito de extratos vegetais, preparados a partir de plantas previamente selecionadas sobre o crescimento de *S. mutans*, *in vitro* e a ação do extrato de maior halo de inibição *in vivo* após sua incorporação em dentifício.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo *in vitro*

O preparo dos extratos vegetais e triagem da ação inibidora *in vitro* contra *S. mutans* foi realizada utilizando-se dois gramas de materiais vegetais (Tabela 1), provenientes de 32 espécies selecionadas a partir de levantamento etnobotânico e colhidas no Horto Botânico do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), fragmentadas e maceradas em 20 ml de solução hidroalcoólica a 70%, obtendo-se extratos a 10%. Após 72 horas, retiraram-se alíquotas que foram

utilizadas nos testes com *S. mutans* (ATCC25175).

Posteriormente, *S. mutans* (ATCC 25175, Fundação André Tosello) foram cultivados em microaerofilia, a 37°C, por 24 horas, em meio de cultura líquido composto de 50 ml de água destilada, 1,8 g de BHI (Brain Heart Infusion) e 0,25 g de extrato de levedura, previamente esterilizado, por 20 minutos, a 127°C. A suspensão bacteriana foi inoculada em meio de cultura BHI-Ágar (Brain Heart Infusion-Agar). Após, inseriram-se nos meios de cultura cilindros de inox de 0,5 cm de diâmetro interno, esterilizados nas mesmas condições, comprimindo-os levemente sobre a superfície do meio. Depositaram-se 100 µL de cada extrato vegetal em cilindros individuais. As placas foram colocadas em jarra microaerófila, por 24 horas, a 37°C e após este procedimento, mediuse os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em duplicata, e como controles negativo e positivo empregaram-se etanol 70% e clorexidina a 0,12%, respectivamente.

O extrato de romã foi o que apresentou maior halo de inibição e, portanto, foi escolhido para as etapas subsequentes. Inicialmente preparou-se um extrato glicólico concentrado, do qual foram retiradas alíquotas para o preparo do extrato glicólico de romã (extrato glicólico concentrado diluído com solução glicólica composta de uma mistura de etanol, glicerol e água na proporção 1:2:1. Para cada 100ml de extrato glicólico concentrado, acrescentaram-se 10g do pó de romã. As diluições do extrato, de 1% à 10%, foram calculadas em séries decimais. Os testes foram realizados conforme descrito anteriormente.

Estudo *in vivo*

A elaboração de um dentifício foi realizada, em função de sua melhor estabilidade farmacotécnica, utilizando componentes básicos e evitando-se a inclusão de conservantes. A Tabela 2 apresenta os componentes e as concentrações utilizadas para os testes *in vivo*. Foram elaborados 3 dentifícios, designados como dentifício A (dentifício base adicionado de 3% de extrato de romã), dentifício B (dentifício base adicionado de 1% de extrato de romã) e dentifício C (dentifício base sem adição de extrato de romã - controle). Estas concentrações foram definidas considerando-se que concentrações inferiores a 2g/Kg/dia apresentam considerável efeito inibitório *in vitro* sem, contudo, provocarem efeitos tóxicos²⁰.

A romã foi incorporada na formulação partindo-se de extrato glicólico da casca da planta a 20%. Após manipulação, os dentifícios foram acondicionados em bisnagas de 60 gramas e rotulados.

O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos

Tabela 1 - Plantas utilizadas na triagem da ação inibidora contra *S. mutans*

Nome científico	Nome vulgar	Parte utilizada	Observações
<i>Aloe arborecens</i>	Babosa de arbusto	folha	Em fase vegetativa; 1,10 m de altura
<i>Anchietia salutarens</i>	Cipó suma	folha	Em fase vegetativa; 1,20 m de altura
<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula	folha e flor	Em fase de floração; 0,42 m de altura
<i>Casearia sylvestris</i>	Guaçatonga	folha	Em fase vegetativa; 3,00 m de altura
<i>Chaptalia nutans</i>	Língua de vaca	folha e flor	Em fase de floração; 0,50 m de altura
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Copaíba	folha	Em fase vegetativa; 0,50 m de altura
<i>Cotyledon orbiculata</i>	Bálsamo	folha	Em fase vegetativa; 0,35 m de altura
<i>Cynara scolymus</i>	Alcanchofra	folha	Em fase vegetativa; 0,50 m de altura
<i>Echinacea angustifolia</i>	Equinacea	folhas e flor	Em fase de floração; 1,00 m de altura
<i>Eryngium pristis</i>	Língua de tucano	folhas e flor	Em fase de floração; 1,50 m de altura
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo da Índia	folha	Em fase vegetativa; 0,50 m de altura
<i>Jatropha curcas</i>	Mertiolate	folhas e flor	Em fase de floração; 0,30 m de altura
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	Saião	folha	Em fase vegetativa; 0,70 m de altura
<i>Lavandula officinalis</i>	Alfazema	folha	Em fase vegetativa; 0,30 m de altura
<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim pimenta	folha	Em fase vegetativa; 0,70 m de altura
<i>Malpighia glabra</i>	Acerola	folha	Em fase vegetativa; 1,50 m de altura
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira santa	folha	Em fase vegetativa; 2,50 m de altura
<i>Mikania hirsutissima</i>	Cipó cabeludo	folha	Em fase vegetativa
<i>Mirabilis jalapa</i>	Maravilha	folha e flor	Em fase de floração; 1,50 m de altura
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa	folha	Em fase vegetativa; 0,50 m de altura
<i>Morus nigra</i>	Amora	folha	Em fase vegetativa; 4,00 m de altura
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca-cravo	folhas e flor	Em fase de floração; 0,40 m de altura
<i>Plantago major</i>	Transagem	folha e flor	Em fase de floração; 0,40 m de altura
<i>Plantago sp</i>	Transagem chinesa	folha e flor	Em fase de floração; 0,40 m de altura
<i>Plantago tomentosa</i>	Tanchagem	folha e flor	Em fase de floração; 0,40 m de altura
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Malvarisco	folha	Em fase vegetativa; 0,70 m de altura
<i>Punica granatum</i>	Romã	folha, flor e fruto	Em fase de floração; 3,00 m de altura
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	folha	Em fase vegetativa; 1,80 m de altura
<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	folha	Em fase vegetativa; 0,40 m de altura
<i>Symphytum officinale</i>	Confrei	folha	Em fase vegetativa; 0,50 m de altura
<i>Talinum patens</i>	Bênção de Deus	folha e flor	Em fase de floração; 1,00 m de altura
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	folha	Em fase vegetativa; 0,40 m de altura

Todas as plantas foram colhidas após 12 dias sem chuva

do Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS sob número de protocolo 31/01. Os voluntários foram examinados e informados sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, conforme Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

Para este estudo selecionaram-se 30 voluntários, que foram divididos em 3 grupos de 10, sendo de ambos os sexos com idade variando de 18 a 25 anos. Estes foram sorteados de forma aleatória, a partir de uma seleção prévia baseada no índice de biofilme visível utilizando-se de fucsina básica 0,5%, com índice mínimo de 40% e experiência de cárie similar. Utilizaram-se como critérios de exclusão voluntários com comprometimento geral de saúde, pacientes fazendo uso de antibióticos, anti-inflamatórios ou qualquer outro medicamento

que poderia interferir na microbiota bucal, uso de próteses dentárias removíveis, fixas com mais de dois elementos ou aparelhos ortodônticos.

Os pacientes foram submetidos à profilaxia profissional para eliminação de biofilme previamente existente e foram instruídos a fazer o uso dos dentífricos 3 vezes ao dia: manhã, após o almoço e à noite e receberam informações sobre o tempo de escovação (3 minutos), técnica (Bass) e o uso de fio dental a cada escovação. Foram distribuídas escovas dentais novas e da mesma marca e modelo para realização de higiene bucal habitual. Realizou-se o controle de biofilme e coleta da saliva para contagem de microrganismos de cada voluntário no primeiro e oitavo dias de uso. Os ensaios *in vivo* foram realizados em delineamento duplo-cego.

Tabela 2 - Formulação do dentifrício de romã utilizado nos testes *in vivo*

Componente	Dentifrício A (%)	Dentifrício B (%)	Dentifrício C (%)
1. Abrasivo (CaCO ₃)	40	40	40
2. Umectante (Glicerol ou sorbitol)	10 (glicerol) + 10 (sorbitol)	10 (glicerol) + 10 (sorbitol)	10 (glicerol) + 10 (sorbitol)
3. Espessante (Carboximetilcelulose)	0,5	0,5	0,5
4. Detergente (Lauril sulfato de sódio)	2	2	2
5. Flavorizante (mentol)	1	1	1
6. Conservante (nipagim)	Não adicionado	Não adicionado	Não adicionado
7. Edulcorante (sacarina)	1	1	1
8. Corante	qsp	qsp	qsp
9. Agente terapêutico (NaF)*	0,1	0,1	0,1
10. Agente terapêutico (romã)	3	1	0
11. Água destilada	qsp 100	qsp 100	qsp 100

Obs: * 1000 ppm = 0,1%

Os biofilmes dentários foram evidenciados com fucsina básica a 0,5% e cada grupo foi submetido a contagem e determinação do índice de biofilme (número de faces coradas x 100/número de dentes x 4)²¹.

Uma amostra de saliva foi coletada entre 8:30 e 10:00 horas e posteriormente diluída com solução salina (NaCl 0,9%) estéril em séries decimais (10⁻¹ a 10⁻⁴) e armazenada em gelo¹¹. Para semeadura empregou-se meio de cultura Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (0,0033g/10ml de água destilada/L de meio). Cada placa foi dividida em 4 partes, sendo que cada uma delas foi inoculada com 0,04 ml de cada diluição, em duplicata. As placas foram incubadas na estufa por 48 horas, a 37°C, em microaerofilia. Após, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em quadrantes que apresentassem entre 30 e 300 UFC de estreptococos do grupo mutans. O resultado final da contagem levou em consideração o número de colônias, o volume inoculado (µL) e a diluição do quadrante em que as colônias foram contadas, fazendo-se a correspondência para o valor de UFC/ml de saliva.

Os resultados obtidos na quantificação do biofilme e na contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) foram submetidos à Análise de variância (SPSS 12.0, Chicago, USA) seguida pelo teste de Tukey para verificação de

contrastes entre os grupos. Em casos onde os valores não apresentavam distribuição normal optou-se pelo teste Kruskal-Wallis. A avaliação do índice de biofilme entre os dois momentos dentro de cada grupo foi realizada por meio de Teste Wilcoxon, com nível de significância p<0,05.

RESULTADOS

A Tabela 3 expressa a ação *in vitro* dos extratos testados sobre *S. mutans*. Observa-se que de todas as espécies testadas, somente os extratos preparados a partir de folhas de copaíba e moringa, flores de alfavaca-cravo e pericarpo seco de romã induziram formação de halos de inibição, sendo o diâmetro do halo produzido pelo extrato bruto de pericarpo de romã, apenas 5% inferior àquele produzido pela clorexidina. Comparando-se as concentrações do extrato de romã testado (10%) e a da clorexidina (0,12%), nota-se que os resultados mostram a ação de extrato cuja concentração é aproximadamente 100 vezes superior a do padrão testado.

A partir dos testes de concentração inibitória mínima contra *S. mutans*, mostrados na Tabela 4, verifica-se que o extrato glicólico de romã na concentração de 3% promoveu o mesmo padrão de inibição que àquele verificado para a clorexidina sobre a mesma espécie.

Tabela 3 - Resultado dos testes *in vitro* contra *S. mutans*

Nome da Planta (Científico)	Nome Popular	Média dos Halos de Inibição (mm)
<i>Copaifera langsdorffii</i> (folha)	Copaíba	16 (± 2)
<i>Moringa oleifera</i> (folha)	Moringa	10 (± 2)
<i>Ocimum gratissimum</i> (flor)	Alfavaca-cravo	08 (± 1)
<i>Punica granatum</i> (pericarpo desidratado)	Romã	18 (± 4)
Clorexidina 0,12%	Controle positivo	19 (± 4)

Tabela 4 - Diluições do extrato glicólico de romã, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Diluições	Média dos Halos de Inibição (mm)
Extrato glicólico de romã a 10%	30 (\pm 6)
Extrato glicólico de romã a 9%	29 (\pm 4)
Extrato glicólico de romã a 8%	29 (\pm 3)
Extrato glicólico de romã a 7%	28 (\pm 4)
Extrato glicólico de romã a 6%	28 (\pm 6)
Extrato glicólico de romã a 5%	28 (\pm 3)
Extrato glicólico de romã a 4%	27 (\pm 2)
Extrato glicólico de romã a 3%	19 (\pm 3)
Extrato glicólico de romã a 2%	13 (\pm 2)
Extrato glicólico de romã a 1%	11 (\pm 2)
Solução glicólica (etanol, glicerol e água)	0
Clorexidina 0,12% (padrão positivo)	19 (\pm 4)

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes às médias dos índices de biofilme dentário no intervalo de tempo previamente determinado para os grupos A, B e C correspondentes ao uso de cremes dentais acrescidos de extratos de Romã (3%), Romã (1%) e grupo controle, respectivamente. Os valores médios obtidos para cada grupo, avaliados individualmente entre o 1º e 8º dias, demonstram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do

índice de biofilme dentário quando o extrato de romã foi empregado em ambas concentrações. Não houve redução significativa para o grupo controle.

As médias apresentadas na Tabela 5 evidenciaram maior redução da colonização microbiana das superfícies dentárias para os grupos A (Romã 3%) e B (Romã 1%) em relação ao grupo C (grupo controle) ($p < 0,05$), Teste Kruskal-Wallis - entre os 3 grupos.

Tabela 5 - Médias dos índices de biofilme dentário (%) em diferentes intervalos de tempo para os grupos A, B e C

Grupos	1º dia	8º dia	Percentual de redução
A (3%)	46,03 (\pm 31,92) ^a	25,28 (\pm 16,94) ^b	45,07% ^A
B (1%)	51,71 (\pm 31,08) ^a	35,28 (\pm 18,56) ^b	31,77% ^A
C (Controle)	45,57 (\pm 30,37) ^a	40,91 (\pm 20,43) ^a	10,22% ^B

^{a,b} Letras superscritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos nas linhas (teste Wilcoxon).

^{A,B} Letras superscritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos nas colunas (teste ANOVA).

Os resultados da contagem do número de colônias de estreptococos do grupo mutans na saliva (UFC/ml) (Tabela 6) não indicaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,984$) entre os grupos A (Romã 3%), B (Romã 1%) e C (grupo controle) no primeiro dia antes do início do uso dos dentífricos, indicando que os grupos estavam

equivalentes em relação ao número de UFC/ml de estreptococos do grupo mutans. Apesar do grupo tratado com dentífrico contendo extrato de Romã 3% ter apresentado uma maior redução do número de UFC/ml após 8 dias, esta também não foi significativa ($p = 0,912$).

Tabela 6 - Médias da contagem do número de colônias de estreptococos do grupo mutans na saliva (UFC/ml x 10⁶) em diferentes intervalos de tempo para os grupos A, B e C

Grupos	1º dia	8º dia	Percentual de redução
A (3%)	89,61 (\pm 21,56)	74,18 (\pm 26,23)	17,22%
B (1%)	82,74 (\pm 23,82)	78,33 (\pm 27,68)	5,33%
C (Controle)	91,64 (\pm 21,68)	91,13 (\pm 33,56)	0,55%

Valor de $p > 0,05$ (ANOVA entre grupos e Wilcoxon entre 1

DISCUSSÃO

Devido à grande biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda por produtos naturais, por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona a investigação científica e a busca por fitofármacos. A literatura relata diversas espécies, distribuídas em diferentes famílias botânicas como úteis no tratamento de afecções odontológicas²². As espécies citadas foram a *Punica granatum L.*, *Salvia officinalis L.*, *Calendula officinalis L.*, *Malva sylvestris L.*, e *Plantago major L.*; as quais justificaram sua investigação dentre outras no presente estudo.

Diversas plantas com histórico popular de utilização medicinal têm sido pesquisadas com a finalidade de prevenir e tratar doenças bucais, especialmente a cárie, a partir da inibição de bactérias acidogênicas e acidúricas como *S. mutans*²³⁻²⁵. O extrato da casca do fruto da romã (*Punica granatum*) comprovou efeito inibitório sobre *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*²³, microrganismos estes envolvidos na etiologia e desenvolvimento da cárie. Contudo, também foram observados que medicamentos fitoterápicos produzidos a partir de sementes de *R. gardneriana* apresentam efeito inibitório sobre *S. mutans*²⁵. Da mesma forma, o extrato das folhas de *Piper betle* apresentou atividade antibacteriana contra *S. mutans* e inibiu o crescimento de biofilmes formados pelas bactérias *S. mutans* e *A. viscosus*²⁴, justificando a avaliação de diversos extratos oriundos de plantas medicinais de uso empírico no presente estudo.

A maior parte das pesquisas com extratos vegetais refere-se a testes isolados com uma ou poucas espécies de plantas, baseadas em informações etnofarmacológicas. No presente estudo, enfocou-se a flora de uma dada região (sul de Minas Gerais), onde várias famílias botânicas foram estudadas. Este delineamento experimental permitiu uma investigação efetiva do potencial farmacológico de diferentes espécies, guiado pelo uso popular para plantas do gênero *Bauhinia* spp. contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos²⁶.

Dentre os diversos extratos testados, o de Romã foi o que apresentou maior halo de inibição nos testes *in vitro*. Através da análise dos presentes resultados, pode-se inferir que o extrato glicólico apresentou maior atividade que o hidroalcoólico, visto que o extrato hidroalcoólico bruto foi preparado em uma concentração de 10%, produzindo halo de 18 mm (Tabela 3), quando comparado ao extrato glicólico que na concentração de 3% produziu halo de inibição similar. A romã é uma planta utilizada pela população brasileira no combate a inflamações e infecções orofaríngeas, sendo empregada na forma de xarope ou seu chá como solução para gargarejo²⁷.

Estudos utilizando o extrato hidroalcoólico de romã (*Punica granatum L.*) como inibidor do crescimento de linhagens de estreptococos acidogênicos e acidúricos também têm sido realizados demonstrando resultados positivos, corroborando os presentes achados²⁸. Diversos estudos relatam a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de *Punica granatum*²⁹⁻³¹, entretanto, a relação entre esse efeito e a composição química só foi estabelecida quando frutos de romã foram submetidos a um fracionamento guiado por testes antimicrobianos³². O resultado foi o isolamento e a elucidação da punicalagina, um tipo de elagitânico com atividade antibacteriana.

Já foi demonstrado que a romã apresenta toxicidade quando em concentrações de 4g/Kg/dia aplicada intragastricamente²⁰. Em concentrações de 2g/Kg/dia não houve alterações nos parâmetros avaliados pelo autor (mortalidade e anomalias cromossômicas). Desta forma, optou-se no presente estudo pela avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) para os testes *in vivo* e obteve-se que o extrato glicólico de romã na concentração de 3% promoveu o mesmo padrão de inibição que aquele verificado para a clorexidina sobre *Streptococcus mutans*. Resultados semelhantes têm sido obtidos por outros pesquisadores²⁸, entretanto, o valor da concentração inibitória mínima nem sempre é apresentado no trabalho. No presente estudo, foi utilizada como padrão a solução de clorexidina a 0,12%, e o extrato glicólico de romã a 3% produziu halo de inibição equivalente a este padrão. Mesmo a CIM do extrato sendo cerca de 30 vezes maior que a do padrão, os resultados são de grande interesse, uma vez que o extrato utilizado estava na forma bruta.

A avaliação *in vivo* do índice de biofilme após 8 dias de utilização de dentifrício contendo extratos de romã indicou redução significativa para ambos os grupos (1% e 3%) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a contagem do número de UFC/ml de estreptococos do grupo mutans na saliva dos voluntários. Estes resultados podem sugerir a influência dos extratos de romã na adesão bacteriana e não na diminuição de microrganismos presentes na cavidade bucal.^{33,34} Como evidenciado previamente em géis de romã, a concentração inibitória mínima de aderência para *S. mutans* (ATCC), *S. mutans* (CI) and *S. sanguis*; foi de 1:16.³⁵ A inibição da síntese de polissacarídeos insolúveis pode influenciar negativamente no processo de adesão bacteriana à superfície dentária²³. Uma vez que a aderência bacteriana tem sido mostrada como um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dentário, a inibição desse processo, certamente, conduzirá a um efetivo controle qualitativo do mesmo.

Algumas limitações do presente estudo devem ser evidenciadas, como por exemplo, a não realização de um ensaio cruzado, onde os voluntários passariam por todas as fases experimentais. Este fato pode acarretar em viés inerente a fatores como variação individual, realização de escovação e hábitos de higiene diferentes que foram minimizados pela profilaxia inicial e instruções de escovação realizadas no início do experimento *in vivo*. Um controle positivo com a inclusão de clorexidina no dentifrício não foi realizado em virtude deste antimicrobiano apresentar sabor desagradável, deixar um gosto metálico na boca e manchar a película adquirida. Adicionalmente, este agente antimicrobiano não é compatível com o detergente empregado nesta formulação³⁶.

O desenvolvimento de dentifrícios incorporados com extratos vegetais tem apresentado resultados promissores. Extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e a *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) em cremes dentais, apresentaram capacidade inibitória *in vitro* contra a mesma cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) utilizada neste estudo, corroborando a eficácia destes produtos quando empregados em dentifrícios³⁷. Assim, novos estudos incorporando estes extratos devem ser realizados com a finalidade de se verificar sua aplicabilidade e perfil comercial na produção de dentifrícios.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a casca da romã (*Punica granatum* L.) apresentou atividade *in vitro* contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) quando macerada em solução hidroalcoólica (etanol 70%) e que esta atividade foi melhorada quando os componentes da casca foram extraídos em solução glicólica. A formulação do dentifrício com extrato de romã mostrou eficiência na primeira semana de uso diminuindo significativamente o índice de biofilme, porém, não apresentou redução do número de estreptococos do grupo mutans.

ABSTRACT

Aim: The present study aimed to evaluate both the inhibitory effect of plant extracts on *Streptococcus mutans* *in vitro* as well as the inhibitory potential of toothpastes containing an extract with a high level impact on both mutans streptococci and biofilm indexes *in vivo*. **Materials and Methods:** Ethanolic extracts from 32 plants were deposited in a culture medium inoculated with *S. mutans* (ATCC25175). After this process, the inhibition halos for all tested extracts were measured. The inhibition capacities were: *Ocimum gratissimum* (flower), 08 mm; *Moringa oleifera* (leaf), 10 mm; *Copaifera langsdorffi* (leaf), 16 mm; and *Punica granatum* (dehydrated pericarp), 18 mm. Since the *Punica granatum* extract presented

the greatest inhibitory halo, it was used in the next stage. The pomegranate extract (*Punica granatum*) was added to toothpastes at 1% and 3% concentrations after having determined the minimum inhibitory concentration. These two concentrations were tested *in vivo* in 30 volunteers, divided into 3 groups (one for each extract and one control group). The volunteers used the toothpastes for eight days. The antibacterial activity was evaluated by determining the biofilm index and by quantifying the mutans streptococci colonies (UFC/ml). **Results:** A reduction ($p < 0.05$) in the biofilm index could be observed when the toothpaste containing the pomegranate extract at 3% was used. However, no difference in the microbiological count after the tested period could be identified. **Conclusions:** It can therefore be concluded that the *Punica granatum* L. extract showed the highest *in vitro* inhibitory activity against *S. mutans*. The toothpaste formulation showed efficiency after eight days of use, significantly decreasing the biofilm rate, but with no reduction in the number of mutans streptococci.

Uniterms: Products with antimicrobial action. *Punica granatum*. Biofilms. Dentifrices. *Streptococcus mutans*. Dental caries.

AGRADECIMENTOS:

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo fomento que suportaram os ensaios desta pesquisa. Um dos autores (LJP) agradece bolsa produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Aos pesquisadores Ana Hortência F. Castro e Poliana Tavares Braga.

REFERÊNCIAS

1. Mohire NC, Yadav AV. Chitosan-based polyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. Indian J Dent Res. 2010; 21:380-4.
2. Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira Mdo S. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42:222-4.
3. Ellepola AN, Khan ZU, Chandy R, Philip L. A comparison of the antifungal activity of herbal toothpastes against other brands of toothpastes on clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Med Princ Pract. 2011; 20:112-7.
4. Taheri JB, Azimi S, Rafeian N, Zanjani HA. Herbs in dentistry. Int Dent J. 2011; 61:287-96.
5. Sofrata A, Brito F, Al-Otaibi M, Gustafsson A. Short term clinical effect of active and inactive *Salvadora persica* miswak on dental plaque and gingivitis. J Ethnopharmacol. 2011; 137:1130-4.

6. Abebe W, Herman W, Konzelman J. Herbal supplement use among adult dental patients in a USA dental school clinic: prevalence, patient demographics, and clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111:320-5.
7. Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MG, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med.* 2011; 77:401-4.
8. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida* associated denture stomatitis. *Fitoterapia.* 2010; 81:323-8.
9. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranyake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.* 2011; 14:87-94.
10. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010; 54:441-54.
11. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol.* 2009; 58:476-81.
12. Lee JG, Messer LB. Intake of sweet drinks and sweet treats versus reported and observed caries experience. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010; 11:5-17.
13. Simões M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Curr Med Chem.* 2011; 18:2129-45.
14. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008; 33:710-6.
15. Erciyas AF, Erciyas K, Sarıkaya R. Genotoxicity of two mouthwash products in the drosophila wing-spot test. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48:2577-80.
16. Guggenheim B, Meier A. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatschr Zahnmed.* 2011; 121:432-41.
17. Chaudhari LK, Jawale BA, Sharma S, Sharma H, Kumar CD, Kulkarni PA. Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2012; 13:71-4.
18. Hofer D, Meier A, Sener B, Guggenheim B, Attin T, Schmidlin PR. Biofilm reduction and staining potential of a 0.05% chlorhexidine rinse containing essential oils. *Int J Dent Hyg.* 2011; 9:60-7.
19. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* doi:10.1093/ecam/nep067
20. Cunha e Silva SL, Borba HR, Bonfim TCB, Carvalho MG, Cavalcanti HL, Barbosa CG. Ação anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia Benth.*, em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetráptera*. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol.* 2003; 58:23-29.
21. Godard A, Dufour T, Jeanne S. Application of self-regulation theory and motivational interview for improving oral hygiene: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:1099-105.
22. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano CS, Farias LM, et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol.* 2008; 53:545-52.
23. Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum Linn.* sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16:88-93.
24. Sharma S, Khan IA, Ali I, Ali F, Kumar M, Kumar A, et al. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:216-22.
25. Samarão SS, Corrêa LAS, Moreira, ASN, Freire MGM, Macedo MLR. Estudo in vitro da atividade do extrato etanólico de sementes de bacupari (*Rheedia gardneriana Planch. & Triana*) e das frações no crescimento de *Streptococcus mutans*. *Rev Bras Plantas Med.* 2010; 12:234-8.
26. Silva KL, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quím Nova.* 2002; 25:449-54.
27. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev.* 2008; 13:128-44.
28. Pereira JV, Silva SC, Filho LS, Higino JS. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum Linn* sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. *Rev Periodontia.* 2001; 12:57-64.
29. Pai MB, Prashant GM, Murlikrishna KS, Shivakumar KM, Chandu GN. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2010; 21:334-6.
30. Faria A, Calhau C. The bioactivity of pomegranate:

- impact on health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011; 51:626-34.
31. Bachoual R, Talmoudi W, Boussetta T, Braut F, El-Benna J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49:1224-8.
32. Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRN, Silva MG, Kuster RM. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc*. 2002; 13:606-10.
33. Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol*. 2012; 141:860-5.
34. Abdollahzadeh SH, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J Dent (Tehran)*. 2011; 8:1-6.
35. Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J*. 2006; 17:223-7.
36. Barkvoll GR, Rølla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scand J Dent Res*. 1988; 96:30-3.
37. Arantes AB, Luz MMS, Santos CAM, Sato MEO. Desenvolvimento de dentifrícios com extratos fluidos de *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) e *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*) destinado ao combate à placa bacteriana. *Rev Bras Farm*. 2005; 86,61-4.

Recebido em 28/06/2012 - Aceito em 15/09/2012

Autor correspondente:

Luciano José Pereira
Universidade Federal de Lavras - UFLA
Setor de Fisiologia e Farmacologia
Caixa Postal 3037
Lavras - MG - Brasil
CEP: 37200-000
E-mail: lucianojosepereira@dmv.ufla.br