

## Fitoterápicos na Odontologia: estudo da punica granatum linn (romã) acerca do efeito antimicrobiano sobre a microbiota patógena na cavidade oral

Nayara Gabryelly Azevedo Duarte<sup>1</sup>  | Lucas Renan Alves dos Santos<sup>1</sup>  | Elias Flávio Quintino de Araújo<sup>2</sup>  | Yallis Maria Barbosa<sup>1</sup>  | Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota<sup>1</sup>  | Patrícia Lins Azevedo do Nascimento<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES-UNITA

<sup>2</sup>Autarquia de Ensino Superior de Garanhuns – AESGA

**Objetivo:** Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano da casca de romã na forma farmacêutica de enxaguante bucal frente microrganismos de interesse odontológico.

**Métodos:** Produziu-se um extrato etanólico da casca da romã para determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM) frente as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*. Utilizou-se placas de 96 poços e concentrações do extrato que variaram de 1000 a 62,5 µg/mL. A partir da CIM, foi elaborado um enxaguante que teve sua eficácia antibacteriana testada frente as mesmas bactérias do teste descrito anteriormente.

**Resultados:** A CIM encontrada para o extrato etanólico de *P. granatum* foi de 125 µg/mL para *E. Coli* e 62,5 µg/mL para *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Sendo bactericida para a primeira e a última bactéria; e bacteriostático para *K. pneumoniae* e *S. aureus*. A partir da determinação da CIM, foi preparada, em farmácia de manipulação, uma solução enxaguante na concentração de 250 µg/mL e os resultados se repetiram conforme o obtido com o extrato bruto etanólico.

**Conclusão:** A solução enxaguante bucal à base do extrato etanólico da *Punica granatum Linn* demonstrou atividade antibacteriana frente às cepas citadas. A partir dos resultados obtidos, verifica-se a importância da realização de outros estudos para que esta solução possa ser testada *in vivo* e posteriormente comercializada.

**Descritores:** antibacterianos; fitoterapia; saúde bucal.

Data recebimento: 27-03-2024

Data aceite: 10-12-2024

### INTRODUÇÃO

A manipulação de plantas para o tratamento de doenças é bastante familiar desde a idade antiga. Na busca da manutenção da saúde geral, houve um aumento na procura por propriedades curativas no ambiente natural<sup>1</sup>. Por apresentar inúmeras possibilidades terapêuticas, a fitoterapia tem se revelado muito proveitosa e uma importante aliada para a medicina. A sua utilização na área da saúde é crescente em função da busca constante de novos medicamentos com alta eficiência, baixa toxicidade e baixo custo<sup>2</sup>.

Os fitoterápicos ganharam força no setor odontológico depois da aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS e no conselho federal de odontologia<sup>3</sup>. Neste sentido está inserida a *Punica granatum Linn*, planta pertencente à família *Lythracaceae*, popularmente conhecida como “romã”<sup>4</sup>.

A romã é rica em vários fitoquímicos que são responsáveis por seu forte potencial antioxidante, anti-inflamatório e antibacteriano<sup>5</sup>. Na forma de enxaguante bucal, a romã pode reduzir o número de bactérias da cavidade oral por conter fitoquímicos, como, por exemplo,

#### Autor para Correspondência:

Yallis Maria Barbosa

Avenida Portugal, 584, Bairro Universitário, Caruaru, Pernambuco. CEP 55016-901. TEL.: (81) 21032000.

E-mail: yallismb03@gmail.com

taninos e flavonoides, que se destacam na ação antibacteriana<sup>6,7</sup>.

A cavidade oral é considerada um local de amplas espécies microbianas, tendo as bactérias como mais numerosas e prevalentes, de modo que convivem de forma harmônica com o hospedeiro. Um item bastante importante é o biofilme dental, que se refere a uma comunidade de microrganismos bacterianos bem arranjados sobre a superfície dentária<sup>2</sup>.

A formação do biofilme dental acontece de forma bastante natural e arranjada, localizada em tecidos moles e duros, e consiste em várias fases. Seu início se dá com a formação de uma película adquirida caracterizada por um conjunto de interações bioquímicas que formam uma camada que é absorvida rapidamente pelo esmalte<sup>8</sup>.

As pesquisas com fontes naturais que têm ações antimicrobianas ajudam no processo de desenvolvimento de novos fitoterápicos e antibióticos. Esses fármacos são importantes pois atuam sobre as bactérias resistentes às medicações disponíveis no mercado<sup>9</sup>.

Diante do exposto, este trabalho avaliou *in vitro* o potencial antimicrobiano da romã (*Punica granatum Linn*) na forma farmacêutica de enxaguante bucal frente aos microrganismos de interesse odontológico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MICRORGANISMOS

As cepas de microrganismos selecionadas para a pesquisa foram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057) e gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665).

### OBTEÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O material botânico constituído pela casca da romã foi colocado em estufa de circulação de ar (Quimis, Brasil) a 40 °C para secagem. Na sequência, as cascas foram trituradas em moinho de facas (New Lab, Brasil) e o pó resultante extraído em etanol P.A (Synth, Brasil) por maceração, na proporção de 2:10 (p/v), durante seis dias. Nesse período, o etanol foi renovado a cada intervalo de 48 horas, totalizando dois ciclos de troca do solvente.

Durante o processo de extração, a solução foi armazenada em potes de vidro, fechados e

embrulhados com papel alumínio, a fim de evitar interferência da luz, sofrendo agitação mecânica diária por 2 horas. A solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo (Fisatom 804, Brasil) sob pressão reduzida, à temperatura de 38°C para eliminação do solvente orgânico. Posteriormente, os extratos resultantes foram removidos do balão de rotaevaporação e levados para estufa de secagem a 30°C para completa eliminação do solvente. A metodologia acima descrita foi seguida de acordo com o método estabelecido por Cunico et al.<sup>10</sup> com adaptações.

### CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para determinação da CIM do extrato etanólico da romã frente os microrganismos testados, foram utilizadas concentrações do extrato que variaram de 62,5 a 1000 µg/mL. Uma concentração estoque do extrato de romã (1000µg/mL) foi preparada em solução de dimetilsulfóxido a 5% em água destilada estéril e diluída nas demais concentrações (500, 250, 125 e 62,5 µg/mL). Todas as concentrações da amostra foram testadas no estudo.

Optou-se pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas de microtitulação de 96 poços. As microplacas foram preparadas dispensando-se em cada poço 100 µL de cada concentração da amostra, 90 µL de caldo Müller Hinton (Kasvi, Brasil) e 10 µL do inóculo padronizado em 10<sup>8</sup> UFC/mL e, posteriormente, incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, 30 µL de resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) em solução aquosa na concentração de 0,01% (p/v) foram acrescidos nos poços e a microplaca retornou para a estufa bacteriológica (SP Labor, Brasil) a 37 °C por mais duas horas. A resazurina é um indicador de oxidorredução empregado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento do microrganismo<sup>11</sup>. Os poços que adquiriram coloração rosada apontaram para a reação química de oxidorredução da resazurina em resorfurina, interpretada como presença de células viáveis, enquanto nos poços em que não houve mudança na coloração do corante se interpretou como ausência de células viáveis, sugerindo inibição do crescimento celular pelo extrato. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibe o crescimento visível de um organismo após o período de incubação<sup>12</sup>.

Dos poços onde foi identificada a concentração inibitória mínima, retirou-se uma alíquota de 10 µL (diluída 1:1000 em água estéril)

de cada poço que, após o uso da resazurina, apresentaram a coloração azul para submeter esse material a uma subcultura em meio sólido contendo Ágar Müller Hinton (Kasvi, Brasil), por 24 horas a 37°C, para determinação do potencial antimicrobiano do extrato (bactericida ou bacteriostático). O controle utilizado foi o digluconato de clorexidina 0,12% sem álcool. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **ELABORAÇÃO E TESTAGEM DA SOLUÇÃO ENXAGUANTE**

Após os testes iniciais para determinação da CIM, em uma farmácia de manipulação comercial (Formular - Farmácia de Manipulação, Brasil), foi elaborado um enxaguante bucal à base do extrato etanólico da casca da romã, na concentração de 250 µg/mL. Esta foi a concentração definida, pois a mesma sofrerá fator de diluição ao ser pipetada nos poços da microplaca de 96 poços, visto que, a alíquota de 100 µL pipetada será diluída pelo conteúdo do poço onde também constará 100 µL de meio de cultura com o inóculo padronizado, o que a deixará com a concentração final de 125 µg/mL.

Para a formulação da solução enxaguante, o extrato da romã foi solubilizado em água destilada, e o qsp (quantidade suficiente para) foi água destilada e acrescido 0,5% metidibromoglutaroniltrilo + fenoxietanol (cosmoguard). Preparou-se um volume de 50 mL do enxaguante.

Para verificar a efetividade do enxaguante à base de romã, testou-se em triplicata a atividade antimicrobiana da solução frente as cepas de *S.*

*aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* em microplacas de 96 poços. Os controles utilizados foram digluconato de clorexidina (0,12%) e Colgate® Total 12 Clean Mint, ambos sem álcool

Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram pipetados nos poços 30 µL de corante resazurina em solução aquosa na concentração de 0,01% e a microplaca retornou para a estufa bacteriológica a 37 °C por mais duas horas. Após o período de revelação, foram feitas as subculturas em meio sólido com Ágar Müller Hinton.

As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Decorrido o tempo estimado, foi realizada a visualização para identificação de unidades formadoras de colônia. Assim, considerou-se que as placas as quais apresentaram crescimento dessas unidades demonstraram atividade bacteriostática e as placas sem crescimento demonstraram atividade bactericida.

### **RESULTADOS**

Foram realizados testes utilizando o extrato etanólico de *Punica granatum* Linn frente quatro bactérias de interesse médico-odontológico. Houve inibição do crescimento de todos os microrganismos em concentrações que variaram de 62,5 a 125 µg/mL. Todos os microrganismos foram inibidos pelos antimicrobianos usados como controle. Os valores encontrados de CIM, assim como o potencial antimicrobiano do extrato diante dos microrganismos testados, são demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico e ação da solução enxaguante da romã frente os microrganismos testados (aplicado fator de diluição).

Microrganismos	CIM	Enxaguante	Mecanismo de Ação
<i>K. pneumoniae</i>	62,5µg/mL		Bacteriostático
<i>E. faecalis</i>	62,5µg/mL	125 µg/mL	Bactericida
<i>S. aureus</i>	62,5µg/mL		Bacteriostático
<i>E. coli</i>	125 µg/mL		Bactericida

Fonte: Elaboração própria. Caruaru, 2023.

A partir do resultado da CIM, foi elaborado um enxaguante bucal com o extrato da romã. Nesta etapa, foi analisada *in vitro* sua ação antimicrobiana frente os mesmos microrganismos. O resultado mostrou efetividade antisséptica do enxaguante à base de romã, repetindo o mesmo resultado encontrado no teste de determinação da concentração inibitória mínima.

### **DISCUSSÃO**

O Brasil tem demonstrado um crescente desenvolvimento de medicamentos à base de fitoterápicos, pois possui uma grande diversidade botânica. Assim, tem sido demonstrada a efetividade e as vantagens desses produtos naturais na terapêutica de infecção, inflamação

e dor, pelas propriedades farmacológicas presentes em suas folhas, flores e casca<sup>13</sup>. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de um enxaguante bucal elaborado a partir da determinação da concentração inibitória mínima do extrato bruto de romã (*Punica granatum* Linn). Os resultados dos testes visuais demonstram claramente o que é descrito na literatura, a respeito do metabolismo de respiração celular converter a resazurina em resorufina e isso ser detectável pela alteração de cor<sup>11</sup>.

Aromã possui alguns compostos químicos importantes, como os taninos e flavonoides presentes na sua composição. Estes compostos podem inibir a ação de algumas enzimas bacterianas, inibindo, assim, o mecanismo de união entre as bactérias na superfície do dente<sup>6</sup>.

Em uma pesquisa, a *Punica granatum* Linn foi testada contra 100 isolados clínicos de *S. aureus*. A CIM foi obtida através de microdiluição e resultou em valores variando entre 50 e 80 µg/mL. Nos resultados, observou-se que o extrato da romã apresentou atividade inibitória no que se refere à cepa citada<sup>14</sup>. No presente estudo, a CIM encontrada foi de 62,5 µg/mL frente o mesmo microrganismo, corroborando com os achados do trabalho citado.

O efeito do extrato metanólico da casca da romã foi testado contra bactérias gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis* e gram-negativas *K. pneumoniae* e *E. coli*. Neste estudo, o extrato mostrou forte espectro contra as cepas citadas, com CIM variando de 200 a 780 µg/mL<sup>15</sup>. Em outro estudo utilizando o extrato metanólico, foram utilizados os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e a atividade antibiofilme do extrato foi avaliada, apresentando capacidade de inibir a formação de biofilmes com CIM de 150 µg/mL para *E. coli*, 250 µg/mL para *S. aureus* e 250 µg/mL para *C. albicans*. Além disso, o extrato rompeu biofilmes pré-formados<sup>16</sup>. No presente trabalho, identificou-se concentrações menores (62,5 e 125 µg/mL) capazes de promover inibição de três desses microrganismos (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*). A diferença de metodologia no processo de extração dos constituintes da romã pode justificar a variação dos valores da CIM entre os estudos.

A atividade antibacteriana da romã frente bactérias gram-positivas e gram-negativas foi analisada em uma pesquisa *in vitro*. Dentre as bactérias testadas, as de relevância com relação aos resultados do presente estudo, foram *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Observou-se inibição de crescimento com CIM de 160 µg/mL a partir do extrato etanólico

de casca<sup>17</sup> que é maior do que os resultados encontrados no presente estudo, mas que pode se justificar pela sazonalidade, técnica de preparo do extrato, entre outras<sup>18</sup>.

Componentes da romã têm propriedades de promover a saúde oral, reduzindo risco de gengivite. Este estudo levantou dados para a possibilidade da utilização de extratos de romã em cremes dentais e enxaguatórios bucais<sup>19</sup>. A casca contém compostos bioativos que incluem fenólicos, flavonoides, compostos de proantocianidina, minerais como potássio, nitrogênio e sódio e polissacarídeos complexos. Além disso, o extrato de romã também foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* em concentrações mais elevadas e retardar o seu crescimento em concentrações mais baixas<sup>20</sup>. Os estudos acima mencionados demonstram evidências consideráveis na eficácia do extrato contra o crescimento microbiano e corroboram com nossos achados.

Outras propriedades do extrato de *Punica granatum* atacam as causas básicas da cárie dentária no menor nível bioquímico, com excelente vigor e agressividade, e possui propriedades anti-inflamatórias que podem ajudar a acalmar tecidos irritados ou úlceras<sup>20</sup>. As propriedades citadas indicam possibilidade de uso em dentífrico, pomada para úlcera bucal e creme antifúngico, além de enxaguatório bucal.

Um estudo cujo objeto foi avaliar o efeito do enxaguante bucal à base de romã sob bactérias formadoras de biofilme obteve resultados que evidenciam sua eficácia na inibição de microrganismos bucais. Contudo, diferentes concentrações são indicadas como possíveis para utilização nesse tipo de enxaguante. A longo prazo, o antisséptico pode ser usado em substituição de outros à base de agentes químicos<sup>21</sup>.

O presente trabalho utilizou-se de extrato etanólico da casca da romã, obtendo uma CIM que variou entre 62,5 a 125 µg/mL. Apesar de comparado com alguns estudos que utilizaram extratos metanólicos sem concentrações variadas, os resultados apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas, corroborando com os dados encontrados na literatura.

Foi realizado um estudo para observar a diferença no acúmulo de placa bacteriana, após o uso de enxaguatório bucal contendo extrato de romã, clorexidina e um enxágue placebo. Depois de garantir que todos os voluntários saudáveis haviam se abstdido de medidas básicas de higiene bucal por quatro dias, os resultados foram observados no quinto dia. Os autores concluíram que os

voluntários que usaram extrato de romã tiveram significativamente menos acúmulo de placa do que aqueles que usaram o enxágue placebo. Além disso, os resultados do extrato de romã foram comparáveis aos da clorexidina<sup>22</sup>. A exposição da cavidade oral aos flavonoides, presentes na romã, pode promover saúde bucal, inclusive inibindo processos relacionados à gengivite<sup>19</sup>.

Portanto, mesmo com diferentes concentrações, as pesquisas mostram o efeito antibacteriano do extrato de diversas partes da romã, bem como a atividade antimicrobiana dos enxaguantes à base romã. Ademais, destaca-se o desempenho dos extratos feitos com a casca do fruto, os quais estiveram presentes em todas as pesquisas citadas.

O presente estudo se diferencia por buscar avaliar a atividade antimicrobiana da casca de romã (*Punica granatum* Linn) a partir da obtenção de seu extrato bruto, o que faz com que a formulação da solução enxaguante obtida a partir deste, seja um produto exclusivo e seus resultados possam contribuir com a ciência, corroborando com o conhecimento empírico da população. Estudos posteriores da solução enxaguante de romã poderão ser executados utilizando isolados clínicos, uma vez que é possível encontrar diferenças no comportamento de microrganismos da mesma espécie isolados de pacientes distintos em relação à suscetibilidade a antimicrobianos. Visto que é possível encontrar diferenças comportamentais entre cepas-padrão e cepas nosocomiais.

## CONCLUSÃO

De acordo com o resultado encontrado na pesquisa, pode-se concluir que o enxaguante à base do extrato etanólico da *Punica granatum* Linn (romã) demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Por se tratar de uma enxaguante à base de um fitoterápico, tem maior aceitação da população, fácil acesso e baixo custo.

A partir desses resultados, indica-se a realização de novos estudos *in vitro* com mais microrganismos para a corroboração dos achados. Futuros estudos *in vivo* também devem ser viabilizados, a fim de garantir o uso seguro e eficaz deste enxaguante.

## ORCID

Nayara Gabryelly Azevedo Duarte: <https://orcid.org/0000-0002-1713-836X>

Lucas Renan Alves dos Santos: <https://orcid.org/0000-0002-1300-8701>  
 Elias Flávio Quintino de Araújo: <https://orcid.org/0000-0002-5057-6089>  
 Yallis Maria Barbosa: <https://orcid.org/0009-0008-9752-7824>  
 Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota: <https://orcid.org/0000-0002-7909-5908>  
 Patrícia Lins Azevedo do Nascimento: <https://orcid.org/0000-0002-6335-0193>

## DESCRÍÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

De uma forma geral, a autora Nayara Duarte, Lucas Renan e Yallis Barbosa participaram ativamente da conceituação, metodologia, preparação do extrato, análise dos dados e resultados, preparação do rascunho original e redação. Elias Flávio ficou responsável pela elaboração e testagem da solução. Enquanto que Patrícia Lins e Cláudia Mota além de ficarem com a revisão e edição também foram responsáveis pela supervisão, administração do projeto e aquisição de Financiamento.

## CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Moghadam ET, Yazdanian M, Tahmasebi E, Tebyanian H, Ranjbar R, Yazdanian A, et al. Current herbal medicine as an alternative treatment in dentistry: *in vitro*, *in vivo* and clinical studies. Eur J Pharmacol. 2020;889:173665.
2. Santos EP, Rodrigues FS, Santos ICRS, Silva KCS, Coutinho GSL, Firmo WCA, et al. *Punica Granatum* L. (Romã) e atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma revisão bibliográfica. Ens Cienc. 2019;23(2):88-93.
3. Silva JMD, Verçosa BMG, Nobre FC, Azevedo LM, Silva MLT, Belo ZS, et al. Utilização de fitoterápicos na odontologia: revisão integrativa. Res Soc Dev. 2020;9(8):e209985370.
4. Queiroz RG, Oliveira SCFS, Fragoso LNM, Flores NC, Freitas ALA, Sousa MLA, et al. *Punica granatum*, *Lippia sidoides*, *mikania glomerata* e *mikania laevegata*: ação sobre o biofilme dental. Arch Health Investig. 2021;10(3):362-7.

5. Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. *Curr Pharm Des.* 2019;25(16):1817-27.
6. Hernawati S, Aldianah BSS, Endah P, Irmawati A. The effectiveness of red pomegranate (*Punica granatum* Linn) extract mouthwash against the number of oral bacteria colony. *Mal J Med Health Sci.* 2020;16 Suppl 4:26-9.
7. Argenta JA, Pasqual M, Pereira CV, Dias DR, Barbosa RA, Pereira LJ. Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro e in vivo. *Arq Odontol.* 2012;48(4):218-26.
8. Ayoub HM, Gregory RL, Tang Q, Lippert F. Influence of salivary conditioning and sucrose concentration on biofilm-mediated enamel demineralization. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190501.
9. Martins FWP, Casali AK. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de Romã (*Punica granatum*, L.) sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Braz J Dev.* 2019;5(11):22970-80.
10. Cunico MM, Carvalho JLS, Kerber VA, Higaskino CEK, Almeida SCC, Miguel MD, et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2004;14(2): 97-103.
11. Montejano HA, Gervaldo M, Bertolotti SG. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. *Dyes Pigm.* 2005;64(2):117-24.
12. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5-16.
13. Ildefonso Junior J, Monteiro AB. Plantas medicinais e fitoterápicos úteis na odontologia clínica: uma revisão medicinal. *Rev Fac Odontol Univ Fed Bahia.* 2020;50(1):47-56.
14. Álvarez-Martínez FJ, Rodríguez JC, Borrás-Rocher F, Barrajón-Catalán E, Micó V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Sci Rep.* 2021;11:588.
15. Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Med Ther.* 2012;12:200.
16. Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian, SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling.* 2013;29(8):929-37.
17. Silva SF, Ferreira-Romanichen FMD, Antonelli-Ushirobira TM. Atividade antimicrobiana in vitro da *Punica granatum* sobre bactérias gram negativas e gram positivas. *Braz J Dev.* 2021;7(11):104581-91.
18. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por Clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Rev Bras Plantas Med.* 2016;18(1 Suppl 1):230-9.
19. DiSilvestro RA, DiSilvestro DJ, DiSilvestro DJ. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phytother Res.* 2009;23(8):1123-7.
20. Narayan T, Deshpande S, Jha A, RamPrasad VP. *Punica granatum* (Pomegranate) fruit and its relevance in oral hygiene. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS).* 2014;13(8):29-34.
21. Dabholkar CS, Shah M, Kathariya R, Bajaj M, Doshi Y. Comparative evaluation of antimicrobial activity of pomegranate-containing mouthwash against oral-biofilm forming organisms: an in vitro microbial study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):ZC65-9.
22. Somu CA, Ravindra A, Ajith S, Ahmed MG. Efficacy of an herbal extract gel in the treatment of gingivitis: a clinical study. *J Ayurveda Integr Med.* 2012;3(2):85-90.

## Phytotherapy in Dentistry: antimicrobial effect of *punica granatum linn* (pomegranate) against pathogenic microbiota of the oral cavity.

**Aim:** To evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of a mouthwash based on pomegranate peel against microorganisms of dental interest.

**Methods:** An ethanolic extract from pomegranate peel was produced, and its minimum inhibitory concentration (MIC) against *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* and *K. pneumoniae* was determined. 96-well plates and extract concentrations ranging from 1000 to 62.5 µg/mL were used. A mouthwash was produced based on MIC, and its antibacterial efficacy was tested against the same bacteria in the previously described test.

**Results:** The MIC found for the ethanolic extract of *P. granatum* was 125 µg/mL for *E. Coli* and 62.5 µg/mL for *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *E. faecalis*, with bactericidal effect for the first and last bacteria and bacteriostatic for *K. pneumoniae* and *S. aureus*. After determining the MIC, the mouthwash solution was prepared with 250 µg/mL concentration and the results were repeated as those obtained with the crude ethanolic extract.

**Conclusion:** The mouthwash solution based on the ethanolic extract of *Punica granatum* Linn demonstrated antibacterial activity against the aforementioned strains. The obtained results reinforce the importance of carrying out further studies so that this solution can be tested *in vivo* and subsequently commercialized.

**Uniterms:** anti-bacterial agents; phytotherapy; oral health.