UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIA ADORNES GALLAS

Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica.

Ribeirão Preto

2017

JULIA ADORNES GALLAS

Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora - Área de concentração: Odontologia Restauradora (opção: Endodontia).

Orientadora**:** Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista de Souza Gabriel

Ribeirão Preto

2017

Não autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura do Autor:_____ Data:__/__/2017.

Ficha catalográfica

Gallas, Julia Adornes.

Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica. Ribeirão Preto, 2017.

82p.: il.;30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora - Endodontia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista de Souza Gabriel

1. Soluções irrigantes, 2. Atividade antimicrobiana,
3. *Punica granatum* L., 4. Extrato natural, 5. Romã

Gallas, J. A.

Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica. 2017. 82p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), 2017.

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora

Presidente: Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista de Souza Gabriel

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Prof.(a) Dr.(a):_____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a):_____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a):_____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Dentística, Endodontia e Gerenciamento de Resíduos Odontológicos (LAGRO), do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; no Laboratório de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, do Departamento de Microbiologia e o Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

À ***Deus*** por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, ajudaram na minha caminhada, e me fizeram ser quem eu sou. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Aos meus pais, ***João Daniel Gallas e Léia Maria Adornes Gallas***, que sempre acreditaram em mim e em meus sonhos, além de terem concedido o bem maior, a minha vida. Sem eles, não estaria trilhando o caminho que estou hoje. Amo muito vocês.

Ao meu marido ***Bruno Ferreira Hossell***, que além de me amar, me apoiar e ser meu companheiro de vida, é um dos meus maiores incentivadores. Meu amor é incondicional.

Á toda minha família, em especial a minha irmã ***Gabriela*** e sogra ***Magaly***, por sempre terem apoiado todas as minhas decisões e me confortado com palavras otimistas. Família é tudo.

AGRADECIMENTOS

À Prof.ª Dr.ª ***Aline Evangelista de Souza Gabriel***, pela orientação acadêmica, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo, por sempre estar disposta a ajudar em qualquer situação, mesmo que não seja de sua alçada, e pela amizade. És um exemplo a ser seguido como professora de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. ***Sérgio Luiz de Souza Salvador***, pela contribuição no delineamento deste projeto e pelos ensinamentos compartilhados, além da disponibilidade do uso de seu laboratório para a execução do mesmo.

Ao Prof. Dr. ***Manoel Damião de Souza Neto***, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, pela oportunidade de ingressar no Programa de Endodontia e expandir meus conhecimentos e estudos na área.

Á técnica de Laboratório ***Marina Del Arco Mastrange***, pela dedicação total e ajuda com os ensaios microbiológicos deste projeto, estando sempre disposta a auxiliar, ensinar e facilitar meu trabalho. Sem tua ajuda esse projeto não teria acontecido.

Á técnica de laboratório ***Débora Fernandes Costa Guedes***, pelos ensinamentos, pela ajuda prestada com a confecções das soluções deste projeto, sempre presente e ajudando no que precisasse. Agradeço de coração pelas horas dedicadas e pelas conversas agradáveis.

Ao técnico de Laboratório ***Mario Sadaiti Ogasawara***, pelos ensinamentos e pelo auxílio com o preparo das soluções deste projeto, sempre prestativo e pronto para auxiliar.

Ao Prof. Dr. ***Jairo Kenupp Bastos***, por ter cedido seu Laboratório para realizar a etapa de confecção dos extratos deste estudo.

Às amigas ***Márcia Weymar*** e ***Paula Barsi*** e às colegas de graduação ***Tharsis Rossato, Thais Formozo*** e ***Keine Gambeta***, que sempre estiveram do meu lado, independente da distância, incentivando com palavras otimistas, trocando conhecimentos e apoiando em todos os momentos.

Aos meus colegas e amigos de Pós-graduação, ***Daniel Filizola, Reinado Neto, Shelyn Yamakami, Tatiana Carvalho, Camila Dória, Gabriela Solano, Isabela Ziotti, Thaís Fillus e Fabiana Curylofo***, pela convicência diária, incentivo e apoio em todos os momentos, que ficarão guardados para sempre em minha lembrança.

Às funcionárias ***Rosângela Angelini, Maria Amália Viesti de Oliveira, Maria Isabel***, por sempre me auxiliarem quando necessário, sempre com um sorriso no rosto.

Aos técnicos de Laboratório ***Patrícia March***i e ***Reginaldo Santana***, por sua companhia diária e incentivo, em especial à ***Patrícia***, pelas conversas, ajudas e treinos de “Spinning” juntas! Obrigada pela amizade.

Ao secretário da Pós-graduação ***Carlos Feitosa***, por sempre ser prestativo, amigo, compreensível, sempre incentivando com palavras amigas e pronto para ajudar.

À ***CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior***, pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

"O entusiasmo é a maior força da alma. Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas" (Napoleon Hill)

RESUMO

GALLAS, J.A. **Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A biodiversidade da flora brasileira abre a possibilidade de estudos com extratos naturais para formulações de soluções irrigantes bactericidas e biocompatíveis para uso na terapia endodôntica. Este estudo teve como objetivo analisar o potencial antimicrobiano de extratos da *Punica granatum* L. (*P. granatum*) contra micro-organismos presentes nas infecções do sistema de canais radiculares. Foram preparados extratos hidroetanólicos (50% etanol e 50% água) na concentração de 100 mg/mL, a partir da liofilização da casca, folha e semente da *P. granatum*, contra os seguintes microrganismos: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Os grupos foram distribuídos de acordo com o extrato de *P. granatum:* G1 – etanol 50% (controle positivo), G2 - hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) (controle negativo), G3 – Extrato da casca, G4 – Extrato da folha, G5 – Extrato da semente. A capacidade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM). Os dados, em mm, foram analisados por Análise de Variância e teste de Tukey ($p<0,05$). Pelo teste de difusão em ágar, verificou-se que, independentemente do micro-organismo, o maior halo de inibição foi encontrado para o controle positivo (30,76 ± 4,73 a), seguido da casca e folha, que não apresentaram diferença significante entre si (23,32 ± 3,65 b e 21,08 ± 2,28 *b*, respectivamente). A semente apresentou o menor halo de inibição microbiana (17,83 ± 6,92 c) ($p<0,05$). Na comparação isolada para cada micro-organismo, os extratos da casca e folha apresentaram atividade antimicrobiana semelhante ao NaOCl para a bactéria *S. mutans* ($p=0,0000$), além de exercerem bom efeito antimicrobiano sobre os demais micro-organismos. Para as bactérias *E. faecalis* e *E. coli*, os extratos (casca, folha e semente) apresentaram halos de inibição semelhantes entre si ($p>0,05$), porém inferiores aos obtidos pelo controle positivo. Com relação à CIM e CBM/CFM, encontrou-se efeito bactericida e bacteriostático para todos os extratos. Verificou-se maior zona de inibição para o extrato da casca contra a *C. albicans* (CIM = 6,25 mg/mL e CFM = 12,5 mg/mL), seguido da *S. aureus* (CIM e CBM =12,5 mg/mL). Concluiu-se que, os extratos hidroalcoólicos de *P. Granatum* L. apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos orais comuns nas infecções endodônticas, com a maior atividade para os obtidos da casca e folha.

Palavras-chave: soluções irrigantes, atividade antimicrobiana, *Punica granatum* L., extrato natural, romã

ABSTRACT

GALLAS, J.A. **Antimicrobial potential of extracts from pomegranate (*Punica granatum* L.) against endodontic pathogens** – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Brazilian flora biodiversity opens possibility of studies with natural extracts for bactericidal and biocompatible solutions for use in endodontic therapy. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial effect of *Punica granatum* L. (*pomegranate*) against pathogens of infections from root canal system. Ethanolic solutions (50% ethanol and 50% water) were prepared in 100 mg/mL of lyophilized extracts derived from the peel, seed and leaf of pomegranate, against the following oral microorganisms: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. The groups were distributed according to the extract tested for root canal irrigation: G1 - 50% ethanol (positive control), G2 - 1% sodium hypochlorite (NaOCl) (negative control), G3 - Solution of the peel, G4 – Seed solution, G5 - Solution of the leaf. The antimicrobial capacity of the extracts was evaluated by the agar diffusion test, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal / fungicidal concentration (MCB/MFC). The data were analyzed by ANOVA (extracts and microorganisms) and Tukey test ($p<0.05$). By the diffusion test in agar, it was verified that, independently of the microorganism, the largest inhibition zone was found for the positive control (30.76 ± 4.73 a), followed by peel and leaf, which did not presented significant difference between them (23.32 ± 3.65 and 21.08 ± 2.28 b, respectively). The seed had the lowest of microbial inhibition zone (17.83 ± 6.92 c) ($p<0.05$). In the isolated comparison for each microorganism, peel and leaf extracts presented antimicrobial activity similar to NaOCl for *S. mutans* ($p = 0.0000$), besides having a good antimicrobial effect on the other microorganism. For the *E. faecalis* and *E. coli*, the extracts (peel, leaf and seed) had similar inhibition zones ($p>0.05$), but lower than those obtained by the positive control. Regarding MIC and MBC/MFC, it was found a bactericidal and bacteriostatic effect for all extracts. The *P. granatum* peel extract had greater inhibition zone against *C. albicans* (MIC = 6.25 mg/mL and MFC = 12.5 mg/mL), followed by *S. aureus* (MIC and MBC = 12.5 mg/mL). It may be concluded that the hydroalcoholic extracts of *P. granatum* L. presented antimicrobial activity against oral pathogens common in endodontic infections, with the highest activity for those obtained from the peel and leaf.

Keywords: irrigating solutions, antimicrobial activity, *Punica granatum* L., natural extract, pomegranate

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO **33**

PROPOSIÇÃO **39**

MATERIAL E MÉTODOS **43**

Delineamento experimental 45

Seleção da concentração do solvente a ser utilizada nos extratos de *P. granatum* 45

Cultivo dos micro-organismos 45

Determinação do crescimento microbiano 46

Método da difusão em ágar 47

Preparo das soluções de *Punica granatum* L. 48

Concentração Inibitória Mínima (CIM) 49

Concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) 50

Análise dos dados 51

RESULTADOS **53**

1. Seleção da concentração do solvente a ser utilizada nos extratos de *P. granatum* ... 55

2. Análise dos halos de inibição dos micro-organismos pelos extratos de *P. granatum* 55

3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 57

4. Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) 58

DISCUSSÃO **61**

CONCLUSÃO **67**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **71**

ANEXO **79**

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos presentes na microbiota oral constituem-se nas principais fontes de agressão persistente, sejam patologias pulpares ou perirradiculares, que além de induzirem alterações teciduais são capazes de perpetuá-las (ESTRELA et al., 2003; BERBER et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2009). A presença de micro-organismos no ambiente pulpar, principalmente de anaeróbios facultativos, tem como consequência a inflamação, e posterior necrose (JORGE, 2007; NAIR, 2004).

De acordo com a situação clínica em que se estabelecem, as infecções dos sistemas de canais radiculares podem ser classificadas em primárias ou secundárias (ESTRELA et al., 2003; GOMES et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2009). A infecção primária é decorrente da colonização dos canais após a necrose do tecido pulpar (PAGLIARULO et al., 2016). Após o preparo biomecânico e ação da medicação intracanal, podem permanecer micro-organismos nos canais, por vezes devido à deficiência dos agentes antimicrobianos (JORGE, 2007). Esses micro-organismos, que não estavam presentes na inicial, podem gerar subprodutos (endotoxinas) que estão associados à infecção secundária, caracterizada por complicações no atendimento clínico, pós-operatório imediato (processos inflamatórios agudos) ou mediato (lesões persistentes) (BERBER et al., 2006; STUART et al, 2006; PAGLIARULO et al., 2016).

A microbiota envolvida nestes dois tipos de infecção é diferente, podendo variar de acordo com o tempo de infecção (SIQUEIRA et al., 2009) ou em função da exposição direta dos canais radiculares ao meio oral (ESTRELA et al., 2003). Cerca de 150 espécies microbianas já foram isoladas em canais radiculares, sendo que um único canal radicular apresenta em média 5 a 7 espécies microbianas infectantes (GOMES et al., 2009). Dentre esses micro-organismos, destacam-se alguns presentes em lesões iniciais e persistentes dos canais radiculares, como a *Escherichia coli (E. coli)* (ABDOLLAHZADEH et al., 2011; ASADISHAD et al., 2012; PAGLIARULO et al., 2016) que é gram-negativa; o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (GOMES-FILHO et al., 2008; ZEYUN et al., 2011), *Streptococcus mutans* (*S. mutans)* (UMAR et al., 2016) e *Staphylococcus aureus (S. aureus)* (GOMES-FILHO et al., 2008; PAGLIARULO et al., 2016) *que* são bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, gram-positivas. Além disso, estudos tem demostrado a presença da levedura *Candida albicans (C. albicans)* em infecções dos canais radiculares (BAKKIYARAJ et al., 2013; ROSAS-BURGOS et al., 2016).

Durante a instrumentação dos canais radiculares, substâncias têm sido utilizadas com o propósito de eliminar micro-organismos e neutralizar seus subprodutos (VIANNA et al., 2006; OLIVEIRA ET AL., 2007). Além disso, é recomendado que o irrigante não tenha toxicidade aos tecidos orais e promova lubrificação e dissolução dos remanescentes teciduais (ESTRELA et al., 2003; BERBER et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2009).

Os produtos químicos mais utilizados como agentes irrigantes são a clorexidina (CHX) e hipoclorito de sódio (NaOCl) (BERBER et al., 2006; BARNHART et al., 2005; HAJIFATTAHI et al., 2016). A clorexidina, em gel ou solução, possui amplo espectro de ação antimicrobiana e a vantagem de apresentar substantividade e baixa citotoxicidade, mas não dissolve tecidos pulpares (SENA et al., 2006). O hipoclorito de sódio também apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana com efetividade comprovada, além da capacidade de dissolver tecidos (GOMES- FILHO et al, 2008; SIQUEIRA et al., 2009; MAHBOUBI et al., 2015). Porém, o NaOCl possui efeitos adversos quando em contato com os tecidos perirradiculares, gosto e cheiro desagradáveis, e capacidade de causar reações alérgicas nos pacientes (GOMES-FILHO et al, 2008; MAHBOUBI et al., 2015; HAJIFATTAHI et al., 2016). Ademais, estudos apontam efeito citotóxico do NaOCl nos tecidos bucais, mesmo em concentrações mais baixas (0,5 a 1%), agindo de forma rápida e direta sobre as células (BARNHART et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2009).

Dessa forma, é constante a busca por soluções a base de extratos naturais com efeito antimicrobiano e com compatibilidade biológica para que possam ser utilizadas na prática clínica (ABDOLLAHZADEH et al., 2011; GHONMODE et al*.,* 2013; ASAHI et al., 2014; LI et al., 2014; ZIOTTI et al., 2016). Há muitos anos as plantas com propriedades medicinais são utilizadas para manutenção da saúde, e nas últimas décadas, as da flora brasileira passaram a ser mais estudadas, especialmente no que se refere a atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2000; VAHABI et al., 2011; DE ROSSI, et al., 2014), culminando com o desenvolvimento de fitoterápicos para uso odontológico. Como exemplo tem-se a própolis (*Dalbergia ecastophyllum*), que se destaca pela ação contra bactérias orais gram-positivas (KORU et al., 2007); o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), que apresenta diversas substâncias com atividade antimicrobiana (FUKAI et al., 2002); o barbatimão (*Stryphnodendron*), que possui taninos que apresentam efeito bactericida e antiviral (SANTOS et al., 2009; DE ROSSI, et al., 2014) e a romã (*Punica granatum* L.), que possui alta concentração de flavonóides que proporcionam ação antioxidante e antimicrobiana (TYAGI, 2012 ZARFESHANY et al, 2014; HAJIFATTAHI et al., 2016).

A romã é uma fruta originária do Oriente Médio, com sementes revestidas por polpa avermelhada, coberta por casca de cor castanho brilhante e contém o suco em bolsas individuais (FISCHER et al., 2011; ZARFESHANY et al., 2014). O pericarpo, o líquido das sementes e a casca possuem polifenóis ou compostos fenólicos, que são os flavonóides (flavonas, catequinas, antocianidinas), ácidos polifenólicos (ácido elágico, punicalaginas, ácido gálico), e taninos (proantocianidina), que encerram propriedades adstringentes, antifúngicas, atividade antioxidante, efeitos anti-inflamatórios e atividade antibacteriana (FISCHER et al., 2011; SALWE et al., 2016; ZANDISWA & MRUDULA, 2016). Os compostos polifenólicos, (punicalagina e ácido elágico) são os principais responsáveis pela

ação antimicrobiana do extrato, pois aumentam a quebra da estrutura da membrana bacteriana e de leveduras, além de interferirem no mecanismo de aderência dos micro-organismos à superfície dentária (VASCONCELOS et al., 2006; SALWE et al., 2016; UMAR et al., 2016).

A punicalagina é um tanino hidrolisável com atividades antioxidante e antiinflamatória reconhecidas, se destacando como promissora molécula multifuncional pelo seu potencial de promover a saúde (SINGH et al., 2002; GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2009; DIKMEN et al., 2015). O ácido elágico constitui-se um polifenol menor, derivado da punicalagina, sintetizado por múltiplas espécies de plantas, com função de proteger os tecidos contra a luz ultravioleta, vírus, bactérias e parasitas, além de elevado potencial antioxidante (SEERAM et al., 2005; KIRAZ et al., 2016; UMAR et al., 2016). Apesar dos componentes puros terem comprovada ação antimicrobiana (SEERAM et al., 2005), poucos são os estudos na área odontológica que avaliam os compostos isolados do fruto (casca e polpa) e folhas da romã.

Estudos na área alimentícia, médica e odontológica, demonstraram a eficácia da *P. granatum* L. para inibição do crescimento de patógenos como *C. albicans* (BAKKIYARAJ et al., 2013; ROSAS-BURGOS et al., 2016), *S. mutans* (UMAR et al., 2016) e *E. coli* (ABDOLLAHZADEH et al., 2011; ASADISHAD et al., 2012). O extrato metanólico da casca da *P. granatum* foi investigado contra *E. faecalis* (HAJIFATTAHI et al., 2016) e *S. aureus* (GOMES-FILHO et al., 2008; PAGLIARULO et al., 2016) e mostraram resultados promissores. A variação hidroalcoólica do epicarpo da romã inibiu a formação de placa supragengival com a mesma eficiência da clorexidina (MAHBOUBI et al., 2015), e reduziu patógenos periodontais, como o *P. gengivalis* (ZANDISWA & MRUDULA, 2016). Além da capacidade antimicrobiana, a toxicidade da solução também deve ser levada em consideração. Estudos têm demonstrado que extratos de *P. granatum* L. possuem baixa toxicidade em macrógafos e linfócitos (KAO et al., 2012; PARK et al., 2016), e inibem o crescimento de células tumorais, em concentrações que variam de 10 µg/mL até 1000 µg/mL (SEERAM et al., 2005; KAO et al., 2012; KIRAZ et al., 2016). Recentemente NIRWANA et al. (2017) demostrou aceleração no processo cicatrizante em alvéolos após extração dental em cobaias quando da utilização de gel de romã.

Portanto, frente à presença de diferentes compostos fenólicos na romã, bem como sua ampla utilização da área da saúde, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas soluções que possibilitem uma diminuição de efeitos adversos e biocompatível, como o desenvolvimento de soluções irrigantes naturais, de *Punica granatum L*. para a irrigação dos canais radiculares.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo geral desenvolver e analisar, *in vitro,* o potencial antimicrobiano de diferentes soluções provenientes da casca, folha e semente da romã (*P. granatum*) contra micro-organismos relacionadas à infecção endodôntica. Para tanto, o estudo possuirá os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver soluções hidro alcoólicas em diferentes concentrações a partir da liofolização da casca, folha e semente *da P. granatum;*
- Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções hidro alcoólicas da casca, folha e semente da *P. granatum*, pelo método de difusão em ágar (halo de inibição) contra os seguintes micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739)*, Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4683) e *Candida albicans* (ATCC 1023);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM, CFM) das soluções hidro alcoólicas extraídas da casca, folha e semente da *P. granatum* contra os mesmos micro-organismos supracitados;

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* com soluções hidro alcoólicas dos extratos da casca, folha e semente da *P. granatum*, contra micro-organismos comumente encontrados nas infecções endodônticas, com o controle positivo hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% e como controle negativo o etanol a 50%. Os micro-organismos analisados foram *a E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans*, tendo como varáveis de resposta: 1) atividade antimicrobiana das soluções de *P. granatum* desenvolvidas, pelo teste de difusão em ágar (halo/zona de inibição microbiana), 2) concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM), pelo método de microdiluição em caldo. Na Figura 1, tem-se a representação esquemática do estudo.

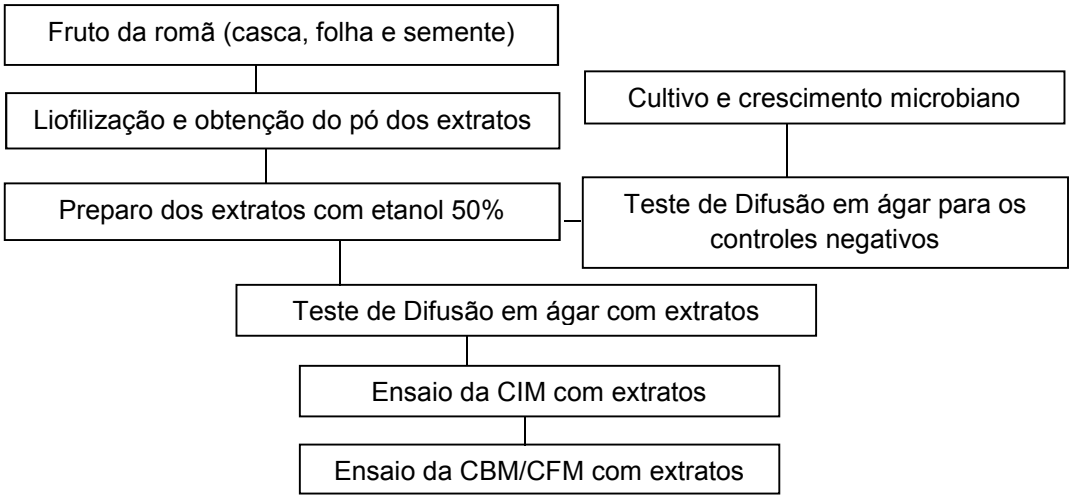

Figura 1 – Representação Esquemática do estudo

Seleção da concentração do solvente a ser utilizada nos extratos de *P. granatum*

Os solventes a serem utilizados nos extratos foram analisados quando a sua atividade antimicrobiana. Para isso, foram preparadas as soluções hidro alcoólicas nas concentrações de 100%, 80%, 50% e 30% (etanol e água), e testados contra as bactérias *S. mutans, E. coli, S. aureus* e *E. faecalis* e contra a levedura *C. albicans*, pelo teste de Difusão em ágar.

Cultivo dos micro-organismos

As 5 cepas (bacterianas e fúngica) relacionadas com a etiologia da contaminação dos canais radiculares utilizadas neste estudo foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),

Staphylococcus aureus (ATCC 6538), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4683) e *Candida albicans* (ATCC 1023), adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA).

As cepas de *E. coli, S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* foram semeadas em 5 mL de caldo Mueler Hinton (MH) (Difco, B.D., Le Pont de Claix, França) e a *E. faecalis,* em 5 mL do caldo tioglicolato (Difco, B.D., Le Pont de Claix, França), em tubos de ensaios de 15x125 mm de volume. Em seguida, foram vedados e incubados em estufa (Modelo Ultra Safe HF 212 UV) a 37ºC por 24 horas. Após esse período, semeou-se com alça bacteriológica em outro tubo de ensaio contendo MH ágar na posição inclinada. Posteriormente, os tubos foram incubados em estufa a 37ºC por 24 horas. O procedimento de semeadura foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil), mantendo-se a cadeia asséptica.

Determinação do crescimento microbiano

Após 24 horas de incubação dos micro-organismos nas condições e meios de cultura específicos, determinou-se a curva de crescimento microbiano utilizando-se o espectrofotômetro (Femto 432; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com absorbância de 600 nm. Inicialmente, determinou-se a curva de absorbância padrão de uma alíquota de 1,0 mL de cada meio de cultura ("branco do método" para calibração), correspondente ao tempo zero de incubação.

Em seguida, verificou-se a absorbância de cada cultura microbiana testada. Os inóculos foram preparados baseando-se na escala de McFarland para bactérias e adaptada para leveduras. Assim, utilizou-se o valor 0,5 da escala McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) para as bactérias e 2,0 da escala McFarland (6,0 x 10^8 UFC/mL) para a levedura. O plaqueamento das cepas microbianas foi realizado para confirmação da viabilidade das bactérias e levedura (Figura 2).

Figura 2. Ilustração das cepas bacterianas/levedura, respectivamente: A) *E. Coli, B) E. faecalis, S. mutans, S. aureus* e *C. albicans*

Método da difusão em ágar

No primeiro momento, realizou-se o teste do poço para selecionar o solvente (controle negativo) com menor atividade antimicrobiana a ser utilizados na extração dos componentes da romã e optou-se pela confecção de um meio de cultura com camada dupla.

No fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil), a camada base foi obtida vertendo-se 10 mL de meio de cultura ágar MH a 50ºC (depois de autoclavado), em placas de petri de 20 x 100mm. Após a solidificação da camada base, adicionou-se a sobrecamada composta de 1 mL de MH dos inóculos microbianos (10^8 células/mL). Após solidificação, foram realizadas 3 perfurações (poços), equidistantes, de 15 mm de diâmetro, de modo a atingir a camada base e sobrecamada, utilizando-se um tubo de ensaio estéril. Em seguida, dispensou-se nos poços 250 µL de cada extrato, utilizando-se pipeta automática.

As placas foram incubadas em estufa a 37±1ºC por 24 horas e, na Figura 3, tem-se a ilustração da sequência do Teste de Difusão em ágar. Os testes com as soluções hidro alcoólicas foram realizados duplicata, e em dias diferentes. A seguir, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500-196-30B, São Paulo, SP, Brasil), mediu-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada poço (HAJIFATTAHI et al., 2016).

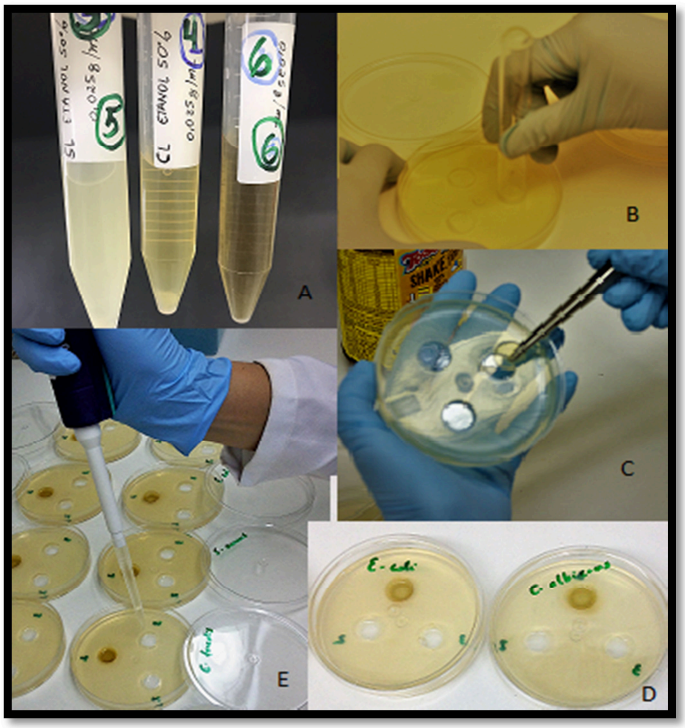

Figura 3. Ilustração do método de difusão em ágar para análise do potencial antimicrobiano: A) Extratos semente, casca e folha; B) Perfuração dos poços de 15 mm de diâmetro; C) Retirada do ágar do poço; E) Preenchimento dos poços com os extratos e controles e D) Aspecto final placa semeada.

Preparo das soluções de *Punica granatum* L.

Após definida a concentração do solvente com menor atividade antimicrobiana, as soluções de *P. granatum* foram preparadas a partir de frutas e folhas da romã obtidas de uma mesma plantação. Foram colhidas aproximadamente 10 frutas maduras, que foram higienizadas com água filtrada corrente e escova. Cada fruto foi cortado ao meio sendo separadas casca e polpa (semente e suco). A seguir, a polpa foi peneirada até que se extraísse todo o suco da semente. O extrato do suco não foi utilizado, devido ao seu alto teor de açúcar, o que poderia alterar o resultado (KIM & LEE, 2002; SANTIAGO, 2014).

As amostras obtidas foram pesadas em balança analítica (Shimadzu, AUW, Baureri, São Paulo, Brasil) e secas pelo método da liofilização (Nova analítica, São Paulo, Brasil) a -80ºC, por 48 h para cada parte da fruta e folha. O método de liofilização foi utilizado a fim de melhor conservar os extratos, para manter suas propriedades fitoterápicas por tempo prolongado, permitindo manipular de forma adequada as concentrações necessárias para o experimento. Dessa maneira, os extratos em pó foram identificados e armazenados separadamente, sob refrigeração, a 4ºC (SANTIAGO, 2014). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, na Tabela 1, encontram-se os rendimentos das partes do fruto utilizadas no estudo.

Tabela 1. Rendimento das partes do fruto da romã, em gramas (g).

	Peso inicial	**Peso após liofilização**
Casca	640	163
Semente	500	144
Folha	46	21
Suco*	100	52

**O pó obtido do suco não foi utilizado.*

A extração e o preparo final das soluções foram realizadas no LAGRO, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. A etapa de extração foi feita segundo a adaptação da metodologia descrita por Kim & Lee (2002). Os extratos foram obtidos a partir de 0,1 g do pó da casca, folha ou semente da romã, diluídos em 1 mL de solução hidroalcoolica de etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) em água, a 50%, conforme descrito previamente. Em seguida, as amostras foram submetidas a sonicação por ultrasson (Cientec, Belho Horizonte, Minas Gerais, Brasil) por 60 min e posterior centrifugação (Odontobras, ATX, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 5 min, em rotação de 1500 rpm, a temperatura ambiente e esse processo foi repetido por 3 vezes até obtenção de extratos límpidos.

O controle positivo selecionado foi hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (Cloro Rio, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), por ter atividade antimicrobiana comprovada contra os micro-organismos das infeções dos canais radiculares.

A seguir, utilizou-se os extratos da casca, folha ou semente da romã em solução hidro alcoólica a 50% para a retificação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar Para tal finalidade, cada um dos micro-organismos indicadores (*S. mutans, E. coli, S. aureus* e *E. faecalis* e *C. albicans*), foi avaliado individualmente. Dessa maneira, em cada uma das placas de petri foram confeccionados 3 orifícios para cada um dos extratos. Esse procedimento foi repetido por 8 vezes e em dias diferentes. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 37ºC por 24 horas e o diâmetro dos halos inibitórios de cada poço foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500-196-30B, São Paulo, SP, Brasil).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada em microplacas de 96 poços de fundo plano. As soluções derivadas da *P. granatum* foram transferidas para eppendorfs e sequencialmente diluídas em água deionizada, partindo-se da concentração de 100 mg/mL para concentrações de 75 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL (Figura 4).

Primeiramente, pipetou-se em cada um dos poços da microplaca 90 µL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco, B.D., Le Pont de Claix, França) duplamente concentrado. A seguir, adicionou-se 10 µL do inóculo padronizado (10^8 UFC/mL) e, finalmente, pipetou-se 100µL de cada uma das diluições dos extratos. Desse modo, o volume final em cada cavidade foi de 200 µL. Depois de preparadas, as microplacas foram incubadas a 37ºC durante 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata (Figura 5). Após esse período, adicionou-se a cada cavidade da microplaca, foi adicionado 50 µL de 0,125% (p / v) de solução de Alamar Blue® (sal de *resazurina*), como indicador de crescimento celular (OSTROSKY et al., 2008).

A menor concentração dos extratos de *P. granatum* onde não mais se observou crescimento microbiano visível (ausência de coloração) foi estabelecida como a concentração inibitória mínima (ABDOLLAHZADEH et al., 2011; ASADISHAD et al., 2012; BAKKIYARAJ et al., 2013; MEHTA et al., 2014; HAJIFATTAHI et al., 2016).

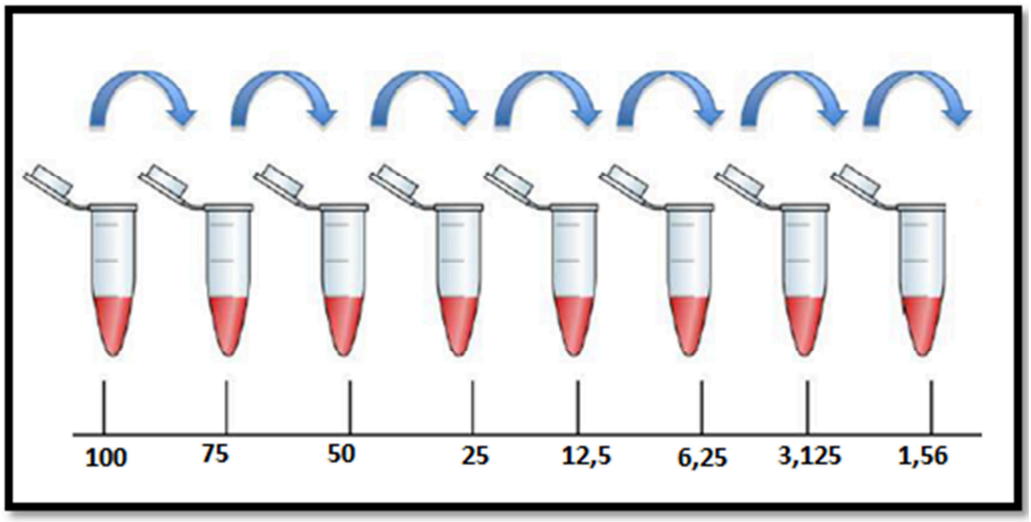

Figura 4. Demonstrativo da diluição em série utilizada para as preparações das concentrações de extratos e suas frações, em mg/mL.

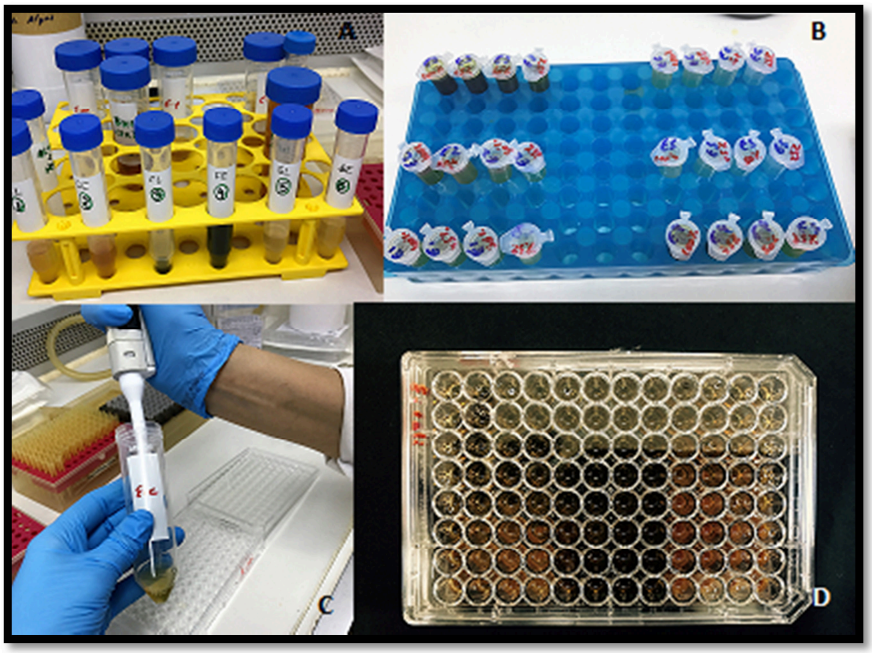

Figura 5. Ilustração da sequência do método da CIM: A) Extratos utilizados; B) Diluições em série; C) Adição do micro-organismo e seu respectivo meio na placa; D) Placa pronta para ir a estufa.

Concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)

A concentração bactericida mínima foi estabelecida como a menor concentração da solução derivada da *P. granatum* que impossibilitou o crescimento microbiano sobre o ágar. Uma alçada de cada cavidade da placa de 96 poços (CIM) foi semeada em placa de Petri contendo ágar MH (HAJIFATTAHI et al., 2016). Para a determinação da CBM e CFM,

as placas foram incubadas a 37ºC durante 24h em atmosfera de microaerofilia (*S. mutans*) ou aerobiose para os demais microrganismos.

Todo o material empregado nos ensaios microbiológicos foi devidamente esterilizado e os procedimentos foram executados assepticamente em capela de fluxo laminar.

Análise dos dados

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software Statistical Package for Social Science* para Windows (SPSS 19, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Os dados referentes ao halo de inibição em mm (extratos de *P. granatum* e micro-organismos) foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov ($p<0,05$), com o objetivo de verificar a distribuição amostral. Considerando-se a distribuição normal dos dados, aplicou-se Análise de Variância, e após o teste complementar de Tukey, com nível de significância estabelecido em 5% ($p<0,05$).

A CIM e CMB/CFM foram determinadas para cada extrato de *P. granatum* e micro-organismos, e expressas em mg/mL.

RESULTADOS

1. Seleção da concentração do solvente a ser utilizada nos extratos de *P. granatum*

Com o intuito de verificar a atividade antimicrobiana dos solventes hidroalcoolicos, utilizou-se o método da difusão em ágar para analisar a menor capacidade antimicrobiana do etanol nas concentrações 100%, 80%, 50% ou 30%.

Observou-se que todas as cepas apresentaram sensibilidade ao etanol 99% (PA), que somente a bactéria *S. mutans* não apresentou halo de inibição frente ao etanol 80%. Todos os micro-organismos testados apresentaram halo de inibição ao etanol concentrado a 50%, confirmando crescimento microbiano (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, em mm, para as diferentes concentrações de etanol*

	Etanol 99%	**Etanol 80%**	**Etanol 50%**
S. aureus	23,69	22,37	0,0
S. mutans	19,42	0,0	0,0
E. faecalis	23,97	20,36	0,0
E. coli	20,60	22,21	0,0
C. albicans	27,02	17,23	0,0

* Valores iguais a 0,0 indicam ausência de halo/zona de inibição microbiana, ou seja, confirmam o crescimento microbiano

Dessa maneira, utilizou-se o etanol 50% para os testes subsequentes e como controle positivo nesse estudo.

2. Análise dos halos de inibição dos micro-organismos pelos extratos de *P. granatum*

Foram preparados extratos hidro alcoólicos da casca, folha e semente de romã com as concentrações de álcool com menor crescimento microbiano (50% e 30%). Observou-se que o extrato de 30%, ao ser preparado, deixou resíduos do pó liofilizado no fundo do recipiente, mesmo após centrifugação da amostra, proporcionando solução não completamente homogênea. Dessa forma, selecionou-se a concentração de etanol a 50% para a extração dos compostos fenólicos deste estudo.

A Análise de Variância e teste de Tukey aplicados aos valores obtidos no halo de inibição mostraram haver diferença estatisticamente significante entre os extratos testados e o controle positivo (NaClO 1%) ($p<0,05$), sendo que todos os extratos hidro alcoólicos a 50% de *P. granatum* (casca, folha e semente) mostraram atividade

antimicrobiana os micro-organismos testados. A Figura 6 ilustra os valores das zonas de inibição dos extratos comparados ao controle positivo (NaOCl 1%).

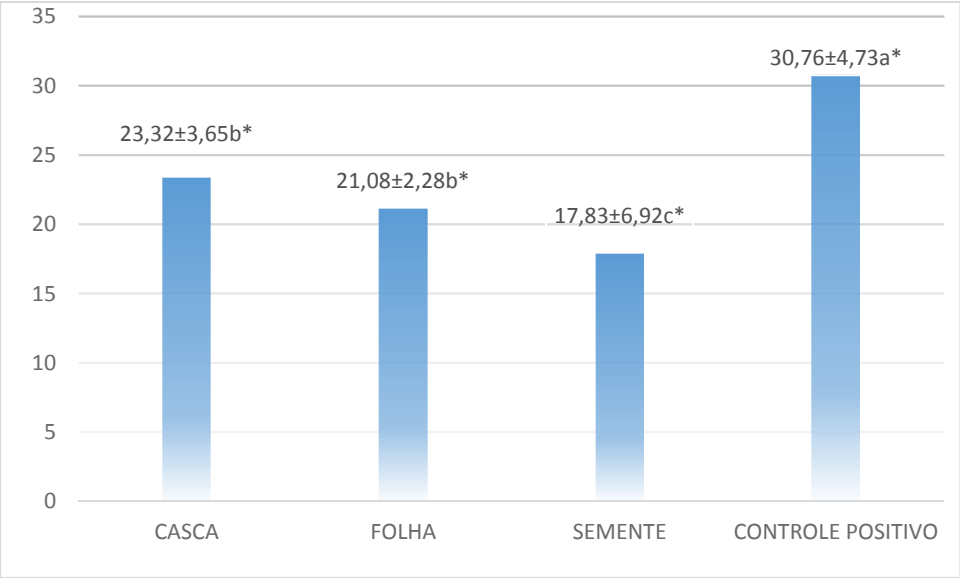

Figura 6. Média e desvio padrão (mm) dos halos de inibição dos extratos hidro alcóolicos de *P. granatum*, pela técnica de difusão em ágar. *Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes (p<0,05)

Independentemente do micro-organismo, verificou-se que a maior zona de inibição foi encontrada para o controle positivo (p<0,05), seguido da casca e folha, que não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si (p>0,05). A semente apresentou o menor halo de inibição microbiana (p<0,05).

Na comparação isolada para cada micro-organismo (Tabela 3), os extratos da casca e folha apresentaram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante ao NaOCl para a bactéria *S. mutans* (p=0,0000), além de exercerem bom efeito antimicrobiano sobre os demais micro-organismos indicadores. Semente e folha apresentaram resultados semelhantes entre si, exceto apenas para a bactéria *S. mutans,* no qual a semente apresentou o menor efeito antimicrobiano. Para as bactérias *E. faecalis* e *E. coli*, os extratos (casca, folha e semente) apresentaram halos de inibição estatisticamente semelhantes (p>0,05), porém inferiores aos obtidos pelo controle positivo. A Figura 7 ilustra as zonas de inibição para os diferentes micro-organismos.

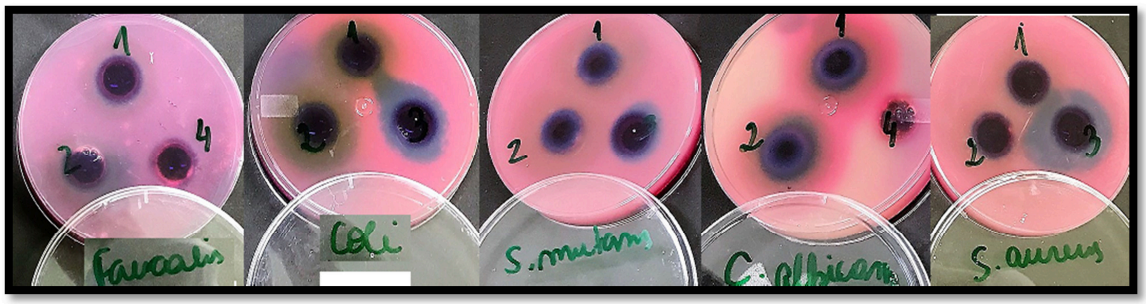

Figura 7. Ilustração do teste de difusão em ágar para os diferentes extratos e micro-organismos.

Tabela 3. Média e desvio padrão (mm) do diâmetro dos halos de inibição dos diferentes extratos hidroalcoolicos de *P. granatum* contra os micro-organismos testados, pela técnica de difusão em ágar (n=8).

	Casca	**Folha**	**Semente**	**Controle positivo (NaOCl)**	**valor de p**
S. aureus	(25,23 ± 4,07) **b***	(21,11 ± 2,59) **c***	(18,46 ± 2,51) **c***	(32,89 ± 1,62) **a***	p=0,0000*
S. mutans	(20,13 ± 1,91) **a***	(20,03 ± 1,11) **a***	(6,67 ± 1,17) **b***	(24,93 ± 1,99**)** **a***	p=0,0000*
E. faecalis	(21,56 ± 2,89) **b***	(19,09 ± 0,65) **b***	(19,24 ± 1,50) **b***	(29,01 ± 1,67) **a***	p=0,0003*
E. coli	(24,53 ± 3,37) **b***	(22,73 ± 2,85) **b***	(22,02 ± 3,54) **b***	(29,13 ± 2,04) **a***	p=0,0004*
C. albicans	(25,19 ± 2,97) **b***	(22,44 ± 1,15) **c***	(22,76 ± 1,23) **c***	(37,81 ± 1,90) **a***	p=0,0000*

*Letras iguais nas linhas representam valores estatisticamente semelhantes (p<0,05). Controle positivo = NaOCl, Controle negativo = Etanol 50%

3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Prepararam-se soluções homogêneas de romã (casca, folha e semente) na mesma concentração (100 mg/mL) para os testes iniciais contra todos os micro-organismos. O crescimento microbiano nas placas de 96 poços foi indicado pela coloração rosa produzida pela metabolização do sal **de** resazurina, que ilustra a menor concentração dos extratos onde não mais se observou crescimento microbiano visível (coloração azul escura).

A Figura 8 ilustra ***a*** placa de 96 poços durante a determinação da CIM e ***o*** Quadro 1 exemplifica a mesma configuração da placa, e contém os valores para todos os microrganismos correspondentes a cada poço.

Quadro 1. Representação esquemática da placa de 96 poços com os valores em mg/mL para a determinação da CIM.

	100%	75%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%		
CASCA	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		Extrato
CASCA	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		Extrato
FOLHA	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		
FOLHA	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		
SEMENTE	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		Controle +
SEMENTE	100	75	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56		Controle -

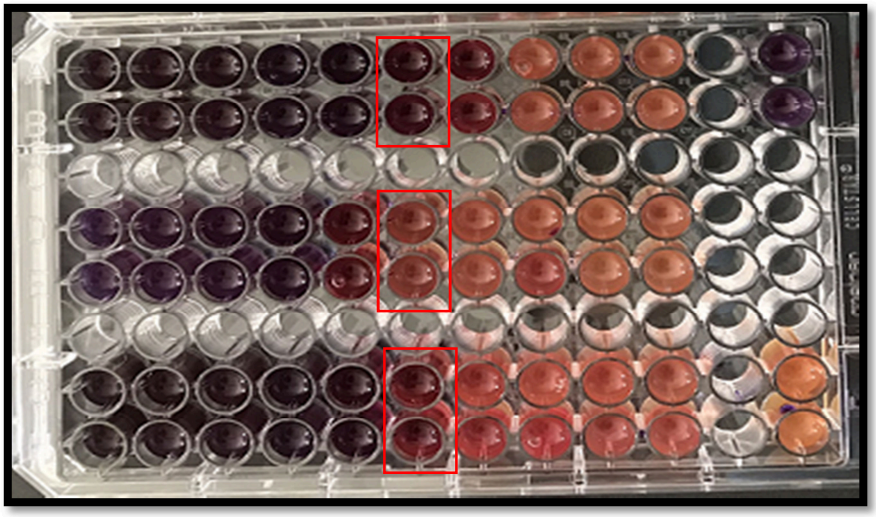

Figura 8. Imagem digitalizada da microplaca de cultura para a determinação da CIM para o micro-organismo *S. aureus*. Até marcada representa CIM igual a 12,5 mg/mL de acordo com o quadro de valores.

Verificou-se que a CIM dos extratos da casca, semente e folha para a bactéria *S. aureus* foi de 12,5 mg/mL.

Esse teste foi repetido para os demais micro-organismos e extratos. A CIM encontrada para as bactérias *E. faecalis* e *S. mutans* foi 50 mg/mL para a casca e folha, e 75 mg/mL para a semente. Já para a bactéria *E. coli,* os valores encontrados foram 25 mg/mL para casca, folha e semente. Por fim, os extratos de *P. granatum* contra a levedura *C. albicans* apresentaram CIM de apenas 6,25 mg/mL para casca e semente, e 12,5 mg/mL para a folha. Na Tabela 4 abaixo, encontram-se os valores finais de CIM e CBM/CFM para extratos e micro-organismos.

4. Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM)

A determinação da CBM e CFM foi realizada da mesma maneira para todos os micro-organismos, após a determinação da CIM.

A CBM para a bactéria *S. aureus* foi 12,5 mg/mL para o extrato da casca, e para os extratos da semente e folha, 50 mg/mL. Para o *S. mutans* e *E. faecalis*, a CBM encontrada foi semelhante para a casca e semente, sendo, respectivamente, 75 mg/mL e 100 mg/mL. No extrato da folha, valores de 75 mg/mL de CBM foram encontrados para a S. mutans e 50 mg/mL, para o *E. faecalis*. Já para a *E. coli*, a CBM para todos os extratos foi a mesma, 50 mg/mL. E no tocante à levedura *C. albicans*, a CFM foi 12,5 mg/mL para a casca, e 25 mg/mL para semente e folha. A figura 9 ilustra e exemplifica as divisões de cada diluição nas placas de petri e o crescimento microbiano. Na Tabela 4, encontram-se os valores finais (CIM e CBM/CFM) de cada extrato para os diferentes micro-organismos.

Figura 9. Imagens digitalizadas das placas de cultura de *C. albicans* para a determinação da CFM. Valores iguais a 25 mg/ml para o extrato da semente e folha e 12,5 mg/mL para o extrato da casca.

Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória mínima e Concentração Bactericida/Funficida Mínima, em mg/mL, para os extratos da casca, folha e semente da *P. granatum*, contra os micro-organismos.

Micro-organismo	Extrato de *P. granatum*					
	Casca		Semente		Folha	
	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM
S. aureus	12,5	12,5	12,5	50	12,5	50
S. mutans	50	75	75	100	50	75
E. faecalis	50	75	75	100	50	50
E. coli	25	50	25	50	25	50
C. albicans	6,25	12,5	6,25	25	12,5	25

De modo geral, a atividade antimicrobiana (CIM, CBM/CFM) foi verificada para todos os extratos hidroalcoolicos de *Punica granatum* L. contra todos os microrganismos testados. Pode-se sugerir que o melhor extrato foi o da casca, contra a levedura *C. albicans*, com atividade bacteriostática de 6,25 mg/mL e bactericida de 12,5 mg/mL, seguida da bactéria *S. aureus*, com atividade bactericida e bacteriostática de 6,25 mg/mL.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a procura de produtos naturais derivados de plantas para a utilização em terapias odontológicas alternativas tem aumentado consideravelmente (NASCIMENTO et al., 2000; OSTROSKY et al., 2008; KATO et al., 2009; TRINDADE et al., 2009; ABDOLLAHZADEH et al., 2011; MEHTA et al., 2014; BHARATH et al., 2015; ZIOTTI et al., 2016). Dentre os fitoterápicos, os extratos derivados da romã (*Punica granatum* L.*)* merecem destaque por possuirem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiarcinogênicas (BAKKIYARAJ et al., 2013; ZARFESHANY et al., 2014; HAJIFATTAHI et al., 2016) e principalmente considerável efeito antimicrobiano (Zandiswa & Mrudula et al., 2011; HAJIFATTAHI et al., 2016; PAGLIARULO et al., 2016; MADUGULA et al., 2017).

Considerando que as infecções dos canais radiculares são de origem polimicrobiana, com predominância de espécies anaeróbicas, (micro-organismos gram-positivos e gram-negativos) (ESTRELA et al., 2003; GHONMODE et al., 2013; DIKMEN et al., 2015), torna-se interessante o desenvolvimento de substâncias irrigantes derivadas da *Punica granatum*, com amplo espectro antimicrobiano para tratamento dos canais radiculares.

Este estudo foi o primeiro a avaliar o efeito antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos da casca, folha e semente de *P. granatum* contra diversos microganismos relacionados às infecções endodônticas (*S. mutans, S. aureus, E. coli, E. faecalis* e *C. albicans*), utilizando os métodos do halo de inibição, CIM e CBM/CFM. A metodologia foi um procedimento laborioso, que exigiu manutenção adequada da temperatura e necessidade de empreender controle de esterilização apropriado, pois havia chances de contaminação.

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas ou teste do poço, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho do halo de inibição com a concentração da substância testada (NASCIMENTO et al., 2000; DUMAN et al., 2009; HAJIFATTAHI et al, 2016). Esse método fornece resultados qualitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos, diferentemente de outros métodos que podem interferir na difusão da solução antimicrobiana (VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008, HAJIFATTAHI et al, 2016).

Outros testes utilizados neste estudo foram o da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM). Para os extratos ativos de plantas tem-se utilizado o método de microdiluição da solução em virtude da simplicidade e rapidez de execução, uma vez que, várias concentrações do produto podem ser testadas em ensaio único (BERBER et al., 2006; HAJIFATTAHI et al., 2016). No entanto, a CIM e a CBM/CFM podem ser influenciadas por vários fatores como a técnica aplicada, a cepa microbiana, a origem da planta, a época da coleta e se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas (NASCIMENTO et al., 2000; BERBER et al., 2006;

HAJIFATTAHI et al., 2016). Assim, para esse estudo tomou-se o cuidado de selecionar frutas frescas e maduras, colhidas de uma mesma plantação e na mesma época.

Para se obter a extração ideal dos compostos fenólicos dessa planta precisa-se de solvente alcoólico, com mistura proporcional de extrato bruto. A litertura demonstra propriedades antimicrobianas favoráveis de extratos metanólicos etanólicos de *P. Granatum* contra micro-organismos orais gram-positivos e gram-negativos (DUMAN et al., 2009; VAHABI et al., 2011; VAHID-DASTJERDI et al., 2014; MAHBOUBI et al., 2015; HAJIFATTAHI et al, 2016). Apesar do metanol possuir a capacidade de dissolver ampla gama de fenóis (ALOTHMAN et al., 2009), no presente estudo, optou-se por utilizar o etanol, pois as misturas etanométricas são mais apropriadas para o consumo humano (ALOTHMAN et al., 2009). Utilizou-se o etanol 50% atuou como controle positivo, pois não apresentou atividade antibacteriana ou antifungica, como também relatado por outros autores (AL-HUSSAINI et al., 2010, DEY et al., 2015; HAJIFATTAHI et al., 2016).

Os resultados deste estudo, para o teste de difusão em ágar, mostraram que os extratos de romã apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas avaliadas. No entanto, o maior halo de inibição foi encontrado para o controle positivo (NaOCl), seguido da casca e folha de romã. O extrato da semente apresentou o menor halo de inibição microbiana.

A explicação para os bons resultados do NaOCl foi devido as suas reconhecidas propriedades antimicrobianas. O hipoclorito de sódio funciona como agente degradante de ácidos graxos, que neutraliza aminoácidos e diminui o pH. O cloro presente em sua composição forma cloraminas, que interferem na ação antimicrobiana, levando a quebra de enzimas bacterianas essenciais (ESTRELA et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2009). No entanto, o NaOCl apresenta efeitos adversos, como toxicidade elevada, gosto desagradável, efeito prejudicial na elasticidade dentinária, o que predispõe o dente à fratura (BARNHART et al., 2005; BERBER et al., 2006; GHONMODE et al.; DIKMEN et al., 2015).

As soluções da casca e folha da romã obtiveram efeito antimicrobiano semelhante ao NaOCl para o micro-organismo *S. mutans*, que corrobora com a maior atividade encontrada no extrato da casca. Essa semelhança se deve a menor sensibilidade que o *S. mutans* apresenta ao NaOCl (BARNABE et al., 2004; ORSI et al., 2011), além da resposta diferente das soluções às metodologias empregadas (SIQUEIRA et al., 2004). A esse respeito, Zandiswa & Mrudula (2011) verificaram, que após 6 e 24 h, o dentifricio a base de *P. granatum* inibiu a formação de biofilme com *S. mutans*, o que sugere que a planta pode proporcionar longo prazo de proteção.

Apesar do NaOCl ter se destacado neste estudo, a literatura demonstra que os resultados encontrados para o extrato da casca foram numericamente semelhantes aos encontrados para Clorexidina 0,12%, com halo de inibição em torno de 20mm (PEREIRA et

al., 2005; BHADBHADE et al., 2011). Assim, os dados deste estudo confirmam o potencial antimicrobiano dos fitoconstituintes presentes na *Punica granatum* L.

Dessa maneira, com relação aos extratos de *P. granatum*, a atividade antimicrobiana dessa planta medicinal está associada à ação dos taninos, principalmente a punicalagina (VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2005; ORAK et al., 2012; MAHBOUBI et al., 2014). A punicalagina isolada da casca da romã pode precipitar as proteínas na superfície celular do micro-organismo e inibir as enzimas metabólicas que causam lise celular, enquanto os demais polifenóis (ácido elágico, ácido gálico) inibem a co-agregação e o crescimento, exibindo atividade antibacteriana/antifúngica por privação de substratos e ação direta sobre o metabolismo microbiano atraves da fosforilase oxidativa (SINGH et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003; ZANDISWA & MRUDULA, 2016). Portanto, extratos de diferentes partes dessa planta possuem níveis variáveis de atividade antimicrobiana, assim como as bactérias têm sensibilidade variável a diferentes extratos, sendo que os componentes da romã isolados mostram melhor efeito antimicrobiano (VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2005).

Neste estudo, os extratos da casca e folha tiveram maior atividade antimicrobiana do que o extrato da semente. A elevada atividade antimicrobiana da casca se deve ao teor de fenólicos e flavonóides 20 a 110 vezes maior do que no suco ou semente, além de sua capacidade oxidante (DEY et al., 2012; DEY et al., 2015). As menores concentrações destes compostos estão nas sementes, que apresentam de 12 a 20% de seu peso total composto de lipídeos (ORAK et al., 2012). Diante disto, estudo recente avaliou o efeito antimicrobiano do extrato etanólico a 50%, pelo teste de difusão em disco, de sementes, cascas e suco de romã contra *S. aureus e E. coli* e relataram que os extratos da casca, independente da concentração, demonstraram atividade antibacteriana, com halo de inibição de 15 – 30 mm (PAGLIARULO et al., 2016).

Ainda assim, apesar do extrato da semente ter demonstrado a menor atividade antimicrobiana, ele foi efetivo para os micro-organismos testados. HAYOUNI et al. (2011) constataram que o extrato de sementes de romã apresentou atividade antimicrobiana contra diversas espécies de micro-organismos, como *S. aureus, E. coli, C. albicans*, o que corrobora os resultados do presente estudo.

Os valores de CIM e CBM/CFM encontrados nesta pesquisa para a levedura *C. albicans* de foram de 6,25 mg/mL (6%) e 12,5 mg/mL (12%) , seguida das bactérias *S. aureus* e *E. Coli*, sendo 12,5mg/mL (12%), com o extrato da casca. Dessa maneira, os resultados deste estudo revelam maior poder inibitório para o extrato da casca do que para os valores encontrados no estudo de Pagliarulo et al. (2016), onde a menor concentração encontrada foi 20 mg/mL para a bactéria *E. Coli*. Já CATAO et al. (2003), avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico da *Punica granatum,* e concluíram que

as cepas apresentaram sensibilidade ao extrato na concentração de 10% para a bactéria *S. aureus*, vindo de encontro à este estudo.

Foram selecionadas nesta pesquisa duas bactérias gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*), que estão geralmente associadas aos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A prevalência delas é maior em infecções secundárias do que em infecções primárias. (SIQUEIRA JR.; GOMES et al., 2004; RÔÇAS et al., 2004; STUART et al., 2006; GOMES-FILHO et al., 2008; ZEYUN et al., 2011) e oferecem grande resistência ao tratamento endodôntico. Em estudo prévio, a CIM mais elevada do extrato da casca foi de 50 mg/ml contra *E. Faecalis* (VAHID-DASTJERDI et al., 2014), similar numericamente a concentração inibitória mínima encontrada neste estudo para esta bactéria, com os extratos da casca e folha.

Quanto ao potencial antifúngico da romã, neste estudo, o extrato da casca teve ação antifungica comprovada, e ainda superior às cepas bacterianas. Estes resultados também são apoiados pelos estudos realizados por DEY et al. (2012), onde a mesma levedura foi sensível ao extrato etanólico de casca. Porém, o mecanismo de ação dos taninos sobre os micro-organismos do gênero *Candida* é desconhecido (VASCONCELOS et al., 2003), e estudo *in vitro* identificou que as leveduras têm sua morfologia alterada quando expostas à ação do extrato bruto ou de elagitaninos isolados da casca do fruto da *Punica granatum* (ENDO et al., 2010).

Em última análise, os resultados dos testes microbiológicos realizados indicam que a potência antimicrobiana dos extratos brutos é superior ao dos extratos purificados e, em particular, da casca. A atividade antimicrobiana claramente maior de extratos brutos pode apoiar o conceito de possíveis componentes hidrofílicos, removidos durante a etapa de purificação, o que pode contribuir sinergicamente para as propriedades antibacterianas (PAGLIARULO et al., 2016). No entanto, a inibição dos micro-organismos envolvidos na infecção dos canais radiculares não justifica o emprego desses extratos na prática clínica.

Contudo, o efeito inibitório sobre biofilmes, a biocompatibilidade e a citotoxicidade são aspectos que devem ser considerados quando da perspectiva de uso clínico dos produtos naturais. Assim, considera-se importante a realização de estudos *in vivo* para comprovar a eficácia dos extratos derivados da *Punica granatum* L. como possibilidade de irrigante alternativo na terapia endodôntica.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, as seguintes conclusões foram obtidas:

(1) Os extratos hidroalcoólicos de *P. Granatum* L., produziram atividade antimicrobiana contra cepas microbiológicas relacionadas às infecções dos canais radiculares: *S. aureus, S. mutans, E. coli, C. albicans,* e *E. faecalis;*

(2) Os extratos da casca e folha da *P. Granatum* tiveram efeito antimicrobiano semelhante ao hipoclorito de sódio a 1% para a bactéria *S. mutans*;

(3) A menor concentração inibitória mínima foi encontrada para extrato da casca da romã, contra a levedura *C. albicans*, seguida das bactérias *S. aureus* e *E. Coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHZADEH S, MASHOUF R, MORTAZAVI H, MOGHADDAM M, ROOZBAHANI N,VAHEDI M. Antibacterial and antifungal activities of punicagranatum peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**, v.8, n.1, p. 1-6, 2011.

AL-HUSSAINI JS, AL-MOHANA AMG. An evaluation of the antifungal activity of some local medicinal plants against growth of *Candida albicans* in vitro. Journal of Veterinary Medical Science, v.9, p.60-68, 2010.

ALOTHMAN M, BHAT R, KARIM AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v.115, p.785-88, 2009.

ASADISHAD B, HIDALGO G, TUFENKJI N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic Escherichia coli strain CFT073.FEMS. Microbiology Letters, v.334, n. 2, p. 87-94, 2012.

ASAHI Y, NOIRI Y, MIURA J, MAEZONO H, YAMAGUCHI M, YAMAMOTO R, AZAKAMI H, HAYASHI M, EBISU S. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on Porphyromonas gingivalis biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, n. 5, p.1164-71, 2014.

BHADBHADE SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, Thakur SL. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence International**, v.42, n.1, p.29-35, 2011.

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 Journal, v. 29, n. 8, p.929-37, 2013.

BARNABE W, DE MENDONÇA T, PIMENTA FC, PEGORARO LF, SCOLARO JM. Efficacy of sodium hipocloryte and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *streptococcus mutans* and *Candida Albicans.* **Journal of oral Rehabilitation,** v. 31, n.5, p. 453-9, 2004.

BARNHART BD, CHUANG A, LUCCA JJ, ROBERTS S, LIEWEHR F, JOYCE AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v.3, n. 8, p.613-5, 2005.

BERBER VB, GOMES BPFA, SENA ME, VIANNA ME, FERRAZ CC. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within the root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v.39, n. 1, p.10-7, 2006.

CATÃO, R. M. R; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A; PEREIRA, M. S. V; HIGINO, J. S; ALVES, J. A; PASSOS, M. G. V. M; SANTOS, V. L. Antimicrobial activity in vitro of the ethanol extract *Punica granatum* against of Staphylococcus aurus strains. **Revista braileira de análises Clínicas**, v. 38, n.2, p. 111-114, 2006.

DE ROSSI A, FERREIRA DCA, SILVA, RAB, QUEIROZ AM, SILVA LAB, NELSON-FILHO P. Antimicrobial Activity of Toothpastes Containing Natural Extracts, Chlorhexidine or Triclosan. **Brazilian Dental Journal,** v. 25, p. 186-190, 2014.

DEY D, DEBNATH S, HAZRA S, GHOSH S, RAY R, HAZRA B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum b-lactamase (ESBL) and metallo-b-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. **Food Chemistry Toxicology**, v.50, n.12, p.4302-9, 2012.

DEY D, RAY R, HAZRA B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant Mycobacterium tuberculosis and β-lactamase producing Klebsiella pneumoniae. Pharmaceutical Biology, n.53, v.10, p.474-80, 2015.

DIKMEN B, GURBUZ O, OZSOY A, EREN MM, CILINGIR A, YUCEL T. Effect of different antioxidants on the microtensile bond strenght of na adhesive system to sodium hypochlorite-treated dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.17, p.499-504, 2015.

DUMAN AD, OZGEN M, DAYISOYLU KS, ERBIL N, DURGAC C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. **Molecules,** vol.14, n. 5, p. 1808–1817, 2009.

ELOFF JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta médica**, v. 64, n. 8, p. 711-13, 1998.

ENDO EH, CORTEZ DA, UEDA-NAKAMURA T, NAKAMURA C,DIAS FILHO BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v.161, n.7, p.534-40, 2010.

ESTRELA C, RIBEIRA RG, ESTRELA CRA, PÉCORA JD, SOUSA NETO MD. Antimicrobial effect of 2% sodiumm hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Brazilian Dental Journal**, v.14, n. 1, p.58-62, 2003.

FISCHER, U. A.; DETTMANN, J. S.; CARLE, R.; KAMMERE R, D. R. Impact of processing and storage on the phenolic profiles andcontents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. **European Food Research Technology**, v.233, p.797–816, 2011.

FUKAI T, MARUMO A, KAITOU K, KANDA T, TERADA S, NOMURA T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapy**, v. 73, p.536-9, 2002.

GHONMODE WN, BALSARAF OD, TAMBE VH, SAUJANYA KP, PATIL AK, KAKDE DD. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* - An in vitro study. J**ournal of International Oral Health**, v.5, n. 6, p.61-6, 2013.

GOMES BPFA, MARTINHO FC, VIANNA ME. Comparison of 2,5% sodium hypoclorite and 2% chlorhexidine gel on bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.10, p.1350-3, 2009.

GOMES-FILHO JE, AURÉLIO KG, COSTA MMTM, BERNABÉ P. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. **Journal of Applied Oral Science**, v.16, n. 2, p.137-44, 2008.

GONZÁLEZ-MOLINA E, MORENO DA, GARCÍA-VIGUERA CAA new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry Journal**, v.115, n. 4, p. 1364-72, 2009.

HAJIFATTAHI F, ELHAM MS, MARYAM T, ARASH M, MOHAMMAD K. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of *Punica granatum* Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. International Journal of Biomaterials. *impress*, 2016.

HAYOUNI EA, MILED K, BOUBAKERC S, BELLASFAR Z, ABEDRABBA M, IWASKI H, Oku H, Matsui T, Limam F, Hamdi M.. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, v.18, n.11, p.976-84, 2011.

JORGE AOC. **Microbiologia bucal. 3.ed.** São Paulo: Santos; 2007.

KAO TY, CHUNG YC, HOU YC, TSAI YW, CHEN CH, CHANG HP, CHOU JL, HSU CP. Effects of ellagic acid on chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal carcinoma cells. Anticancer Research, v. 32, n.10, p.4413-8, 2012.

KIRAZ Y, NEERGHEEN-BHUJUN VS, RUMMUN N, BARAN Y. Apoptotic effects of non-edible parts of *Punica granatum* on human multiple myeloma cells. Tumour Biology Journal, v. 37, n. 2, p.1803-15, 2016.

KIM, D. O.; LEE, C. Y. Extraction and Isolation of polyphenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: Wiley, 2002. Ref. I1.2.1, I1.2.2.

KORU O, TOKSOY F, ACIKEL CH, TUNKA YM, BAYSALLAR M, GUCLU AU, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v.13, p.140-5, 2007.

LI J, PAN L, NAMAN CB, DENG Y, CHAI H, KELLER WJ, KINGHORN AD. Pyrrole alkaloids with potential cancer chemopreventive activity isolated from a goji berry-contaminated commercial sample of *African mango*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p.5054-60, 2014.

MAHBOUBI A, ASGARPANAH J, SADAGHIYANI PN, FAIZI M. Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. **Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n. 1, p.366–72, 2015.

MEHTA VV, RAJESH G, RAO A, SHENOY RBHMP. Antimicrobial Efficacy of *Punica granatum* mesocarp, Nelumbo nucifera Leaf, Psidium guajava Leaf and Coffea Canephora Extract on Common Oral Pathogens: An In-vitro Study. Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors, v. 8, n. 7, p.65-8, 2014.

NASCIMENTO GGF, LOCATELLI J, FREITAS PC, SILVA GL. Antibacterial activity ofplant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**,v. 31, p.247-56, 2000.

MADUGULA P, REDDY S, KONERU J, RAO AS, SRUTHI S, DALLI DT. Rhetoric to Reality-Efficacy of *Punica Granatum* Peel Extract on Oral Candidiasis: An in vitro Study. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v.11, n. 1, p. ZC114–ZC117, 2017.

NAIR PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, v.15, n. 6 p.348-81, 2004.

ORAK HH, YAGAR H, ISBILIR SS. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. **Food Science of Biotechnology**, n.21, v.2, p.373–87, 2012.

ORSI IA, JUNIOR AG, VILLABONA CA, FERNANDES FH, ITO IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerized acrilic resin. **Gerodontology,** v. 28, n.7, p.253-7, 2011.

OSTROSKY EA., MIZUMOTO MK, LIMA MEL, KANEKO TM, NISHIKAWA SO, FREITAS BR. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.18, n.2, p. 301–307, 2008.

PAGLIARULO C, VITO VD, PICARIELLO G, COLICCHIO R, PASTORE G, SALVATORE P, VOLPE MG. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Food Chemistry**, v.190, n. 1, p.824-31, 2016.

PARK S, JIN KS, JUN YK, HWA-JS, YOUNG MK, YONG CB. Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extract in THP-1 Cells Exposed to Particulate Matter PM10. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, p. 1-11, 2016.

PEREIRA JV, PEREIRA MSV, HIGINO JS, SAMPAIO FC, ALVES PM, ARAÚJO CRF. Estudo com o extrato da Pungica granatum Linn. (Romã): efeito antimicrobiano avaliação clínica de um dentifrício sobre micro-organismos do biofilme dental, **Revista Odonto Ciência**, v.20, n.49, p.262-8, 2005.

ROSAS-BURGOS EC, BURGOS-HERNÁNDEZ A, NOGUERA-ARTIAGA L, KAČÁNIOVÁ M, HERNÁNDEZ-GARCÍA F, CÁRDENAS-LÓPEZ JL, CARBONELL-BARRACHINA ÁA. Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel Extracts as Affected by Cultivar. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.97, n.3, p.802-810*,* 2016.

SALWE KJ, SACHDEV DO, BAHURUPI Y, KUMARAPPAN M. Evaluation of antidiabetic, hypolipedimic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p.56-2, 2015.

SANTIAGO, MCP. Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.). **Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS VR, GOMES RT, OLIVEIRA RR, CORTÉS ME, BRANDÃO MGL. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **Interntional Journal of Dentistry,** v.8, n.1, p.1-5, 2009.

SEERAM NP, ADAMS LS, HENNING SM, NIU Y, ZHANG Y, NAIR MG, HEBER D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. Journal of Nutritional Biochemistry, v.16, n. 6, p.360-7, 2005.

SENA NT, GOMES BPFA, VIANNA ME, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **Internatinal Endodontic Journal**, v.39, n.11, p.878-85, 2006.

SINGH RP, CHIDAMBARA MURTHY KN, JAYAPRAKASHA GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p.81-6, 2002.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, ALVES FRF, SILVA MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodotic, v. 107, n. 5, p.721-6, 2009.

STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. Enterococus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n.2, p.93–8, 2006.

TYAGI, S.; SINGH, A.; BHARDWAJ, P.; SAHU, S.; YADAV, A. P.; KORI, M. L. Punicalagins - A Large Polyphenol Compounds Found in Pomegranates: A Therapeutic Review. **Academic Journal of Plant Sciences**, v.5, n.2, p.45-49, 2012.

UMAR D, BAHIJA D, MOHAMMED F, ARSHIYA A, KUSAI B. The effect of pomegranate mouthrinse on Streptococcus mutans count and salivary pH: An in vivo study. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, v. 7, n. 1, p.13-16, 2016.

VAHABI S, NAJAFI E, ALIZADEH S. In vitro antimicrobial effects of some herbal essences against oral pathogens. **Journal of Medicinal Plant Research**, vol. 5, n. 19, p. 4870–8, 2011.

VAHID-DASTJERDI E, ABDOLAZIMI Z, GHAZANFARIAN M, AMDJADI P, KAMALINEJAD M, MAHBOUBI A. Effect of *Punica granatum* L. flower water extract on five common oral bactéria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, n. 12, pp. 1688–1694, 2014.

VASCONCELOS LCS, SAMPAIO FC, SAMPAIO MCC, PEREIRA MSV, HIGINO JS, PEIXOTO MHP. Minimum inhibotory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C.albicans.* **Brazilian Dental Journal**, v.17, n. 3, p.223-7, 2006.

VIANNA ME, Horz H-P, GOMES BPFA, CONRADS G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals cntaining necrotic pulp tissue. **International Endodontic Journal**, v.39, p.484-92, 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. **Journal of Health Science**. V.51, p.590–6, 2005.

YEDDES N, CHÉRIF JK, TRABELSI M. Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids na betacyanins of peel and pulp of three Tunisian Opuntia forms. **Antioxidnts**, v.2, p. 37-51, 2013.

ZANDISWA G, MRUDULA P. Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bactéria *Streptococcus mutans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, n. 25, p.45-9, 2016.

ZARFESHANY A, ASGARY S, JAVANMARD SH. Potent health effects of pomegranate. **Advanced Biomedical Research**, v. 25, n. 3, p.100-5, 2014.

ZEYUN MA, WANG Y, ZHU X, ZHANG C, LI S, SHEN Y, HAAPASALO M. Role of Polymorphonuclear Neutrophils in the Clearance of *Enterococcus faecalis* Derived from Saliva and Infected Root Canals. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 3, p.346–52, 2011.

ZIOTTI IR, PALMA-DIBB RG, CORONA SA, SOUZA-GABRIEL AE. Viability of using natural extracts in dental restorative treatment. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 8, p.53-61, 2016.

ANEXO

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do extrato de Punica granatum L. para o tratamento do sistema de canais radiculares: Atividade antimicrobiana da solução e efeito na resistência de união do material obturador à dentina

Pesquisador: JULIA ADORNES GALLAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61743716.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.845.146

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores tem por objetivo avaliar, in vitro, a efetividade do extrato de romã - Punica granatum L. (P. granatum) - como solução irrigadora antimicrobiana, e como agente biomodificador da dentina a fim de aumentar a resistência adesiva do cimento endodôntico ao canal radicular.Serão preparadas duas soluções de P. granatum com diluições em meio aquoso e etanólico e realizado o rastreamento fitoterápico dos componentes dos extratos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ambas as soluções serão testadas contra as bactérias presentes em lesões persistentes dos canais radiculares, Enterococcus faecalis (ATCC 4683) e Staphylococcus aureus (ATCC 6538), e a mais efetiva será empregada nos demais testes.Serão selecionados 100 incisivos inferiores humanos, as coroas serão seccionadas, os canais radiculares instrumentados, esterilizados e contaminados com as bactérias. O espécimes serão distribuídos em 5 grupos de acordo com a solução utilizada para a instrumentação dos canais e irrigação final. Ao final, as seguintes variáveis de resposta serão analisadas: a atividade antimicrobiana (n=10) da

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0483 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.845.140

solução de P. granatum (teste de difusão em ágar, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e contagem de
microrganismos), a resistência adesiva (n=10) da solução à dentina radicular (teste de push-out) e a morfologia da interface adesiva (n=6) (MEV). Os
dados serão submetidos à análise estatística mais apropriada para cada teste (p<0,05).

Objetivo da Pesquisa:
O presente estudo tem como objetivo geral analisar in vitro o efeito de uma solução rica em polifenóis, obtida a partir do extrato de P. granatum no
tratamento do sistema de canais radiculares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Projeto in vitro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Pesquisa relevante para a área da odontologia, apresenta referências bibliográficas atualizadas e os pesquisadores são plenamente habilitados para o desenvolvimento do projeto em tela.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Adequados. TCLE, declaração de infraestrutura, cronograma detalhado, declarações do Biobanco e projeto em word.

Recomendações:
Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:
Aprovado conforme deliberado na 198ª Reunião do CEP/FORP/USP, em 30/11/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0483 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br