

# ESTUDOS COM O EXTRATO DA *Punica granatum* Linn. (ROMÃ): EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO SOBRE MICRORGANISMOS DO BIOFILME DENTAL

*STUDIES WITH THE EXTRACT OF THE Punica granatum* Linn. (POMEGRANATE): EFFECT ANTIMICROBIAL "IN VITRO" AND TRIAL AVALIATION OF A TOOTHPASTE UPON MICRORGANISMS OF THE ORAL BIOFILM

---

Pereira, Jozinete Vieira\*  
Pereira, Maria do Socorro Vieira\*\*  
Higino, Jane Sheila\*\*\*  
Sampaio, Fábio Correia\*\*\*\*  
Alves, Pollianna Muniz\*\*\*\*\*  
Araújo, Cristina Ruan Ferreira\*\*\*\*\*

---

---

## RESUMO

A atividade antimicrobiana *in vitro*, CIM (Concentração Inibitória Mínima), CIMA (Concentração Inibitória Mínima de Aderência) e a CBM (Concentração Mínima Bactericida) do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) foi avaliada em cinco linhagens bacterianas do biofilme dental: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*. Em estudo comparativo com o gluconato de clorexidina, os resultados demonstraram efetiva ação inibitória de ambas as substâncias. O extrato da romã foi efetivo na CIMA das cinco linhagens ensaiadas, representada pela ausência de aderência ao vidro na presença de sacarose. A atividade antimicrobiana *in vivo* do extrato da romã foi testada em 13 pacientes, através do uso de um dentifrício a base desse extrato e foi observadas redução do número de *Streptococcus mutans* (53,84%) e Índice de Sangramento Gingival. Conclui-se, portanto, que o extrato da *Punica granatum* Linn., apresentou potente atividade antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* sobre as linhagens do biofilme dental. Os resultados sugerem a utilização do extrato da romã em indicações terapêuticas na prática odontológica.

**UNITERMOS:** biofilme dental; *Punica granatum* Linn.; *Streptococcus*; *Lactobacillus*.

## SUMMARY

The *in vitro* antibacterial activity MIC (Minimum Inhibitory Concentration), MICA (Minimum Inhibitory Concentration of Adherence) and MBC (Minimum Bactericide Concentration) of the extract of pomegranate (*Punica granatum* Linn.) was evaluated upon five bacterial strains of the oral biofilm: ***Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei***. In comparative study with the chlorhexidine (0,12%), both substances showed antibacterial activity. The extract was effective regarding adherence on glass tube with sucrose (MICA) in all five tested strains. The *in vivo* antibacterial activity of the extract of pomegranate was evaluated in 13 subjects that used a toothpaste with extract and was observed reduction of the number of ***Streptococcus mutans*** (53,84%) and Gingival Bleeding Index. It can be concluded that the extract of *Punica granatum* Linn. showed antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* upon bacteria strains of the oral biofilm. The results supports that the extract of the pomegranate can be used as a therapeutic antibacterial agent in Dentistry.

**UNITERMS:** oral biofilm; *Punica granatum* Linn.; *Streptococcus*; *Lactobacillus*.

---

\* Professora Doutora Adjunta de Estomatologia da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB.

\*\* Professora Adjunta do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

\*\*\* Professora Adjunta do Departamento de Farmácia da UFPE.

\*\*\*\* Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social da UFPB.

\*\*\*\*\* Mestrandas em Diagnóstico Bucal pela Universidade Federal da Paraíba/UFPB.

## INTRODUÇÃO

Modesto et al.<sup>12</sup> (2001) definiu o biofilme dental como um aglomerado de microrganismos, contido em uma matriz orgânica formada por substâncias da saliva, dieta do hospedeiro e por polímeros bacterianos. A remoção mecânica do biofilme dental é um fator importante na prevenção da cárie e doença periodontal. No entanto, diversos autores confirmam que existem dificuldades na remoção quando realizada pelo próprio paciente.

Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene, agentes antimicrobianos têm sido propostos por apresentar ação específica no controle ou desenvolvimento do biofilme dental. De Micheli et al.<sup>3</sup> (1990), Marsh<sup>11</sup> (1992), Rodrigues Júnior<sup>16</sup> (1998) e Saba-Chujfi et al.<sup>17</sup> (1999) relatam que diversas substâncias a exemplo de enzimas, fluoretos, compostos clorados do fenol e detergentes catiônicos têm sido utilizados como inibidores do mecanismo de formação e crescimento do biofilme dental.

Os produtos de origem vegetal foram pouco estudados *in vivo* apesar de se mostrarem potencialmente eficazes *in vitro* no que se refere a sua atividade antimicrobiana sobre várias espécies de microrganismos da cavidade bucal.

Estudos *in vitro* sobre a ação anticariogênica de taninos (polifenóis) extraídos de plantas têm sido relatados nas últimas décadas por Kakiuchi et al.<sup>9</sup> (1996), Ooshima et al.<sup>14</sup> (1993) e Yanagida et al.<sup>20</sup> (2000). Os extratos da romã (*Punica granatum* Linn.) sanguinarina (*Sanguinaria canadensis*), cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.), camomila (*Matricaria chamomilla* Linn.) têm demonstrado ação antibacteriana e antiadente *in vitro* sobre os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos em estudos realizados por Naqvi et al.<sup>13</sup> (1991). Pereira<sup>15</sup> (1998) observou em pesquisa *in vitro* que os *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* possuem sensibilidade ao extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) no que se refere ao seu crescimento apresentando halos de inibição de até 20 mm de diâmetro.

Diante dos estudos *in vitro* sobre os efeitos do extrato da romã em alguns microrganismos do biofilme dental, justifica-se, portanto a necessidade de comprovação destes efeitos através de ensaios clínicos.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do

biofilme dental: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*, e clinicamente (*in vivo*) a ação antimicrobiana do extrato da romã na forma de um dentífrico.

## MATERIAL E MÉTODO

### Preparação do extrato da *Punica granatum* Linn.

A matéria prima (fruto) da *Punica granatum* Linn. foi obtida de origem diversa, no mercado público central de João Pessoa e identificada botanicamente no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB. O método de extração empregado foi a lixiviação ou percolação em fluxo contínuo à temperatura ambiente.

### Técnica preparatória do dentífrico

O aglutinante e espessante foram misturados ao umectante e edulcorante juntamente com o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. em uma quantidade suficiente de água destilada, agitou-se vigorosamente até a formação de uma mucilagem homogênea. A esta mucilagem, acrescentou-se o corpo polidor ou abrasivo, devidamente tamizado e o espumante, adicionou-se água, agitando-se lentamente evitando-se a formação de espumas. Após a obtenção da pasta homogênea, agitou-se vigorosamente até a consistência de um creme macio e brilhante, que foi envasado logo após obtenção, evitando-se o seu ressecamento.

### Linhagens bacterianas

Foram utilizadas no presente trabalho linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

### Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para o screening e para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn., sobre as linhagens bacterianas. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, ou seja, presença do halo de inibição.

### Determinação da concentração inibitória mínima em meio líquido

A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método da diluição em meio líquido descrito por Courvalin et al.<sup>1</sup> (1985). Foi considerada como Concentração Inibitória Mínima a menor concentração da droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

### Determinação da concentração mínima bactericida

A determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi realizada conjuntamente com a Concentração Inibitória Mínima, utilizando-se o método proposto por Courvalin et al. (1985). A Concentração Mínima Bactericida foi definida como a menor concentração do extrato que apresentou 0,1 ou 0,01% de bactérias sobreviventes.

### Determinação da concentração inibitória mínima de aderência

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada na presença de sacarose a 5%, usando-se concentrações crescentes e dobradas da solução diluída do extrato, variando de 1:1 a 1: 1024. A CIMA foi definida como a menor concentração do agente em meio com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

### Utilização da clorexidina – controle positivo

De maneira semelhante à descrita nos itens acima foram preparadas diluições seriadas e decrescentes a partir de uma solução de clorexidina (Periogard®) a 0,12%.

### Seleção da amostra

A amostra foi constituída por 25 crianças matriculadas na Escola de 1º Grau Lions – Tambá, João Pessoa-PB. Todas as crianças, mães e/ou responsável, participaram de uma palestra prévia, onde foram instruídas sobre a pesquisa e assinaram as respectivas autorizações. Como condições para participar do experimento foram estabelecidas: a faixa etária, de 10 a 12 anos de idade; a presença de 20 elementos dentários, Índice de Higiene Oral Simplificado (IHO-S) seja maior que 2; níveis microbiológicos de *Streptococcus mutans* elevados na saliva; susceptibilidade para formar placa e com inflamação gengival; ausência de doença sistêmica; não estarem sob uso de bochechos antissépticos e/ou creme dental. A amostra foi dividida em dois grupos: Grupo I (de estudo) e Grupo II (de controle).

### Métodos para avaliação dos Índices de Higiene Oral Simplificado (IHO-S), Sangramento Gengival (ISG) e Placa (IPL)

Foram realizados através dos Índices de Higiene Oral Simplificado (IHO-S), proposto por Grene et al.<sup>5</sup> (1964), Índice de Sangramento Gengival (ISG) segundo Coutinho et al.<sup>2</sup> (1997) e de Placa (IPL) de Silness et al.<sup>18</sup> (1964), descrito por Løe<sup>10</sup> (1967).

### Contagem de *Streptococcus mutans*

As amostras da saliva requerida para a determinação da contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* foram coletadas e a contagem realizada segundo técnica preconizada por Gold et al.<sup>4</sup> (1973).

## RESULTADOS

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima *in vitro*, em meio sólido, em termo de diâmetro dos halos de inibição do extrato da romã e gluconato de clorexidina sobre as linhagens ensaiadas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido do extrato hidroalcoólico da romã sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhagens	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Concentração do extrato (mg/ml)									
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>S. mitis</i>	25	23	21	19	16	15	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	20	18	14	11	0	0	0	0	0	0
<i>S. sanguis</i>	21	20	17	14	0	0	0	0	0	0
<i>S. sobrinus</i>	24	22	22	22	20	20	17	13	13	12
<i>L. casei</i>	22	18	15	12	12	12	11	10	0	0

EP - Extrato puro.

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhagens	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Concentração do gluconato de clorexidina a 0,12%									
	SD	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>S. mitis</i>	18	16	14	12	10	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	18	18	17	14	14	0	0	0	0	0
<i>S. sanguis</i>	20	18	15	14	12	0	0	0	0	0
<i>S. sobrinus</i>	24	24	23	20	17	10	0	0	0	0
<i>L. casei</i>	23	22	21	19	17	15	12	10	0	0

SD - Sem diluição.

### Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 – Concentração Bactericida Mínima do extrato de *Punica granatum* Linn. sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhagens	Concentração Mínima Bactericida do extrato	
	CMB (diluição do extrato)	CMB-S
<i>S. mitis</i>	1:128	1:128
<i>S. mutans</i>	1:64	1:32
<i>S. sanguis</i>	1:16	1:16
<i>S. sobrinus</i>	1:4	1:4
<i>L. casei</i>	1:32	1:16

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Linhagens	Extrato da Romã	Gluconato de clorexidina a 0,12%
<i>S. mitis</i>	1:512	1:128
<i>S. mutans</i>	1:256	1:256
<i>S. sanguis</i>	1:128	1:64
<i>S. sobrinus</i>	1:256	1:16
<i>L. casei</i>	1:1024	1:64

### Contagem de *Streptococcus mutans* na coleta direta da saliva antes e após o uso do dentifício da romã (*Punica granatum* Linn.)

A Tabela 5 apresenta as médias do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) de *Streptococcus mutans*, observadas antes e após o uso do dentifício da romã (*Punica granatum* Linn.)

### Contagem de *Streptococcus mutans* na coleta direta da saliva antes e após o uso do dentifício controle

As médias do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) de *Streptococcus mutans*, observadas antes e após o uso do dentifício Phillips, estão apresentadas na Tabela 6.

### Determinação do Índice de Sangramento Gengival antes e após o uso do dentifício da romã (*Punica granatum* Linn.)

Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 5 – Médias de UFC/ml de *Streptococcus mutans* sp. antes e após o uso do dentifício da romã em escolares no período de 30 dias.

Escolares	UFC/ml antes do uso do dentifício	UFC/ml após o uso do dentifício	Diferenças do n° de UFC/ml (antes e após)
01	$5,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	+/-
02	$5,44 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	-
03	$3,01 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	-
04	$1,08 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	-
05	$2,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	+/-
06	$1,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	+/-
07	$1,3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3$	-
08	$5,9 \times 10^3$	0	-
09	$3,1 \times 10^3$	$2,37 \times 10^4$	+
10	$6,9 \times 10^3$	$1,38 \times 10^4$	+
11	$1,44 \times 10^4$	0	-
12	$4,68 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	-
13	$5,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	+/-

(+) Aumento do n° de *Streptococcus mutans*.  
 (-) Diminuição do n° de *Streptococcus mutans*.  
 (+/-) Não alteração do n° de *Streptococcus mutans*.

TABELA 6 – Médias de UFC/ml de *Streptococcus mutans* sp. antes e após o uso do dentifício controle em escolares no período de 30 dias.

Escolares	UFC/ml antes do uso do dentifício	UFC/ml após o uso do dentifício	Diferenças do n° de UFC/ml (antes e após)
01	$3,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^3$	+/-
02	$1,5 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	+/-
03	$0,4 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$	+/-
04	$0,1 \times 10^3$	$1,38 \times 10^4$	+
05	$4,6 \times 10^3$	$1,62 \times 10^4$	+
06	$4,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	+/-
07	$0,6 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	+/-
08	$0,8 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	+/-
09	$7,0 \times 10^3$	$1,04 \times 10^4$	+
10	$0,2 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	+/-
11	$0,2 \times 10^3$	$0,9 \times 10^3$	+/-
12	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^3$	+/-

(+) Aumento do n° de *Streptococcus mutans*.  
 (-) Diminuição do n° de *Streptococcus mutans*.  
 (+/-) Não alteração do n° de *Streptococcus mutans*.

TABELA 7 – Médias do índice de sangramento gengival antes e após o uso do dentifício da romã em escolares no período de 30 dias.

Escolares	ISG <sub>1</sub> (antes)	ISG <sub>2</sub> (depois)
01	21	17
02	07	02
03	16	09
04	07	02
05	05	07
06	26	12
07	12	10
08	05	04
09	31	31
10	04	04
11	06	05
12	16	04
13	06	02
Média Final	12,5	8,4

0 = ausente; 1-15 = leve; 16-30 = moderada; >30 = severa

### Determinação dos Índices de Sangramento Gingival antes e após o uso do dentifrício controle

A Tabela 8 representa as médias do índice de sangramento gengival.

As Médias (Desvio Padrão) do índice de sangramento gengival antes e após o uso do dentifrício de romã e do dentifrício controle estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 8 – Médias de pontos de sangramento gengival antes e após o uso do dentifrício controle em escolares no período de 30 dias.

Escolares	ISG <sub>1</sub> (antes)	ISG <sub>2</sub> (depois)
01	02	06
02	04	15
03	12	09
04	03	01
05	02	02
06	12	20
07	06	08
08	03	08
09	06	11
10	15	13
11	06	04
12	06	08
Média Final	6,4	5,4

0 = ausente; 1-15 = leve; 16-30 = moderada; >30 = severa

TABELA 9 – Médias (Desvio Padrão) do índice de sangramento gengival antes e após o uso do dentifrício da romã e do dentifrício controle.

Dentifrício	ISG (antes)	ISG (depois)	Valor de p**
Romã	12,5 (8,9)	8,4 (8,1)	< 0,01
Controle	6,4 (8,7)	8,7 (5,4)	NS
Valor de p*	< 0,05	NS	-

NS - Não significativo.

\* Teste t de Student; \*\* Teste t de Student Pareado.

### Determinação do Índice de Placa antes e após o uso do dentifrício da romã (*Punica granatum* Linn.)

Os resultados das médias do índice de placa antes e após o uso do dentifrício da romã, estão apresentados na Tabela 10.

### Determinação do Índice de Placa antes e após o uso do dentifrício controle

A Tabela 11 representa a média do índice de placa antes e após o uso do dentifrício controle.

As Médias (Desvio Padrão) do índice de placa antes e após o uso do dentifrício da romã e do dentifrício controle, estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 10 – Médias dos índices de placa em escolares antes e após o uso do dentifrício da romã por um período de 30 dias.

Escolares (dentifrício romã)	Índice de placa	
	Antes	Após
01	1,29	1,12
02	1,37	1,08
03	1,66	1,66
04	0,95	0,50
05	1,00	1,12
06	0,95	1,16
07	0,79	0,50
08	0,87	0,37
09	2,08	2,16
10	1,20	1,08
11	0,95	1,62
12	1,20	1,66
13	0,79	1,54
Média Final	1,2	1,2

TABELA 11 – Médias dos índices de placa em escolares antes e após o uso do dentifrício controle por um período de 30 dias.

Escolares	Índice de placa	
	Antes	Após
01	0,90	1,04
02	0,79	1,45
03	0,80	1,00
04	1,87	1,60
05	1,04	1,30
06	2,50	2,29
07	2,16	1,66
08	2,60	1,16
09	1,29	1,58
10	2,20	2,08
11	1,58	1,75
12	1,08	0,80
Média Final	1,6	1,5

TABELA 12 – Médias (Desvio Padrão) do índice de placa antes e após o uso do dentifrício da romã e do dentifrício controle.

Dentifrício	IP (antes)	IP (depois)	Valor de p**
Romã	1,2 (0,4)	1,2 (0,5)	NS
Controle	1,6 (0,6)	1,5 (0,4)	NS
Valor de p*	NS	NS	-

NS - Não significativo.

\* Teste t de Student; \*\* Teste t de Student Pareado.

## DISCUSSÃO

Nesse estudo, verificou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Punica granatum* Linn. sobre espécies de microrganismos aeróbios predominantes no biofilme supragengival. Os resultados demonstraram que todas as linhagens foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. (Tabela 1).

O extrato da romã mostrou também atividade bactericida entre as concentrações crescentes e dobradas de 1:4 a 1:128 sobre os microrganismos, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* respectivamente (Tabela 3).

Os dados obtidos no presente estudo demonstram a eficácia do extrato da casca do fruto da romã (*Punica granatum* Linn.) quando comparado aos obtidos pelo gluconato de clorexidina (Tabela 2), mostrando a potencialidade de ambas as substâncias como agentes antimicrobianos eficazes sobre os microrganismos do biofilme dental.

A romã (*Punica granatum* Linn.) é basicamente composta quimicamente por taninos (substâncias polifenólicas) e alcalóides que são substâncias dotadas de ação antimicrobiana. Segundo Haslam<sup>6</sup> (1996) os compostos fenólicos agem inespecificamente sobre os microrganismos, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos e diminuindo os lipossacarídeos e as proteínas do biofilme dental.

O extrato de *Punica granatum* Linn. também foi efetivo na inibição da aderência das cinco linhagens ensaiadas, representada pela ausência de aderência ao vidro na presença de sacarose, dados apresentados na Tabela 4. O maior efeito inibitório de aderência foi observado na linhagem de *Lactobacillus casei* na concentração 1:1024; seguido pelo *Streptococcus mitis* 1:512; o *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* 1:256 e o *Streptococcus sanguis* 1:128.

A presença de polissacarídeos extracelulares é de extrema importância na fase inicial do processo de formação do biofilme, pois os mesmos favorecem ao mecanismo de aderência intermicrobiana de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* de acordo com Ikeno et al.<sup>7</sup> (1991), Thylstrup et al.<sup>19</sup> (1988).

Os resultados demonstraram uma maior efetividade do extrato da romã sobre a inibição da aderência, quando comparados aos apresentados pela clorexidina. O extrato da romã foi efetivo na inibição de aderência sobre o *L. casei* na concentração 1:1024 e a clorexidina 1:64; seguido do *S. mitis* da inibição na concentração de 1:512 para 1:128; o *S. sobrinus* 1:256 e a clorexidina 1:16; o *S. sanguis* 1:128 para 1:64.

Os resultados demonstraram uma efetiva atividade antimicrobiana do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre todos os microrganismos ensaiados, sugerindo desta forma, o uso desse agente em concentrações que atinjam a CIM ou CIMA na cavidade bucal, visando impedir a for-

mação e consolidação do biofilme. A inibição da síntese de glucano e a sua ação bactericida possibilitam a este extrato um efeito no controle do biofilme já estabelecido e conseqüentemente prevenção da cárie dentária e da gengivite.

### **Estudo do dentifrício à base de *Punica granatum* Linn.**

#### **• Contagem de *Streptococcus mutans* antes e após o uso de dentifrícios**

No presente estudo, após 30 dias de aplicação do dentifrício da romã nos escolares por duas vezes ao dia, foi verificada uma redução do número de *Streptococcus mutans* em sete (53,84%) dos pacientes, cujo índice de UFC/ml foi reduzido em 10 vezes o número de bactérias, conforme demonstrado na Tabela 5. Em dois (15,38%) pacientes o número de UFC/ml foi reduzido de 10.000 UFC/ml para o valor zero. Estes resultados sugerem a potente atividade da composição química do dentifrício da romã na redução do número de microrganismos no biofilme dental.

A correlação entre a prevalência de cárie e o nível de *Streptococcus* do grupo *mutans* na saliva já foi demonstrada. Protocolos clínicos que visam diminuir os níveis de *Streptococcus* levam invariavelmente à redução da doença cárie. Este fato é concordante com os achados de Jannesson et al.<sup>8</sup> (2002).

Avaliando-se comparativamente os ensaios bacteriológicos antes e após a realização da escovação com o dentifrício controle, observou-se que não ocorreu redução quantitativa do número de *Streptococcus mutans* presentes na cavidade bucal, o que difere significativamente da ação antibacteriana do dentifrício da romã usado pelos escolares (Tabela 6).

Os nossos resultados são promissores, visto que as dificuldades de execução dos meios mecânicos para o controle do biofilme dental, nos conduz sempre a rever formas alternativas, mais fáceis de atuação, mas com a mesma eficácia, então, fica-se a espera de novos produtos ou novas técnicas em prol de uma melhor qualidade de vida.

### **Estudo Clínico – Índice de Sangramento Gengival e Índice de Placa antes e após o uso do dentifrício**

No presente estudo foi observada uma média de índice de sangramento gengival de 12,46 (Média de Desvio Padrão 8,9) antes da utilização do dentifrício da romã. Após 30 dias as médias do ISG corresponderam a 8,38 (DP = 8,10) o que

mostra uma redução significativa do índice de sangramento gengival em resposta ao uso do dentifrício da romã. Do total de 13 crianças analisadas houve uma redução de gengivite em 10 crianças (76,9%), dados apresentados nas Tabelas 7.

Com relação a utilização do dentifrício controle os resultados obtidos não mostram significância quando comparados ao dentifrício da romã, dados apresentados na Tabela 9.

Os resultados da medida do índice de placa após a utilização do dentifrício da romã, como também do dentifrício controle, foram semelhantes, não havendo redução do mesmo (Tabela 12). Os resultados sugerem que a limpeza mecânica não foi significativa, no entanto, embora houvesse placa, a mesma estaria com uma quantidade reduzida de microrganismos.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho é lícito concluir que:

1. O extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) produziu uma significativa atividade antibacteriana (bacteriostática e bactericida) *in vitro* sobre as linhagens de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*, principais microrganismos do biofilme dental.
2. O extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) apresentou potencial efeito na inibição da síntese de glucano representada pela aderência ao vidro, sobre todos os microrganismos ensaiados e que são os principais responsáveis pela instalação e consolidação do biofilme dental.
3. A inibição da síntese de glucano e a ação bactericida do extrato da romã possibilitam um efeito na redução e no controle do biofilme já estabelecido.
4. O uso do dentifrício da romã (*Punica granatum* Linn.) reduziu significativamente o número de *Streptococcus mutans* na cavidade bucal em estudo comparativo com um dentifrício controle.
5. Após a utilização do dentifrício da romã houve uma redução significativa do índice de sangramento gengival, correlacionado ao dentifrício controle, no entanto não ocorreu redução no índice de placa, embora os resultados obtidos sugerissem uma redução no número de microrganismos formadores do biofilme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Courvalin P, et al. L'antibiogramme, Paris: MPC – Videom;1985.
2. Coutinho TC, Tostes MA. Prevalência de gengivite em crianças. RGO (Porto Alegre). 1997;45(3):170-174.
3. De Micheli G, Sarian R. Placa bacteriana: controle químico; estudo clínico em humanos da eficiência de dois produtos, comparados com um placebo, quando utilizados na forma de bochechos imediatamente antes da higiene bucal (pré-escovação). Revista da APCD (São Paulo). 1990;44(6):333-6.
4. Gold OG, Jordan, HV, Van Houte J. A selective Medium for *Streptococcus mutans*. Archs Oral Biol (Oxford). 1973;18:1357-64.
5. Grene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. JADA. 1964;68:7-13.
6. Haslam, E. Natural Polyphenols (*Vegetable tannins*) as drugs: possible modes of action. J Nat Prod. 1996;59:205-15.
7. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991;25:347-51.
8. Jannesson L, et al. Effect of a triclosan-containing toothpaste supplemented with 10% xylitol on mutans streptococci in saliva and dental plaque. Caries Res. 2002;36:36-9.
9. Kakiuchi N, et al. Studies on dental caries prevention by traditional medicines.8. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem Pharm Bol. 1996;34(2):720-5.
10. Loe H. The Gingival index, the plaque index and the retention index systems. J Periodontol (Chicago). 1967;38(6):610-4.
11. Marsh PP. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res (Washington). 1992;71(7):1431-8.
12. Modesto A, Lima KC, Uzeda MA. Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês: estudo *in vitro*. Revista da APCD (São Paulo). 2001;55(1):43-8.
13. Naqvi SAH, Khan MSY, Vohora SB. Anti-bacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on indian medical plants. Revista de Fitoterapia. 1991;62(3):221-8.
14. Ooshima T, et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in: SPF Rats Infected with mutans streptococci. Caries Sciences. 1993; 27:124-9.
15. Pereira JV. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. João Pessoa, 1998. [Dissertação de Mestrado em Odontologia – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba].
16. Rodrigues Júnior AL. Redução do índice de placa com Listerine. Avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. RGO (Porto Alegre). 1998;46(2):101-8.
17. Saba-Chujfi E, et al. The importance of chemical control of the plaque on oral hygiene through the activity of the antiseptic triclosan (2,4,4-trichloro-

- 2-hydroxyldiphenyl ether), associated with a copolymer and fluoride. Revista Paulista de Odontologia (São Paulo). 1999;21(6):17-24.
18. Silness J, Loe H. Periodontal disease pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontologica Scandinavia. 1964; 22:121-35.
19. Thylstrup A, Fejerskov O. Tratado de cariologia. In: \_\_\_\_\_. Formação, composição e ultra-estrutura dos depósitos microbianos na superfície dos dentes. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988, p.43-60.
20. Yanagida A, et al. Inhibitory Effects of Apple Polyphenols and Related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. J Agric Food Chem. (Chiba). 2000;48:5666-71.

Recebido para publicação em: 19/11/2004; aceito em: 08/03/2005.

**Endereço para correspondência:**

JOZINETE VIEIRA PEREIRA  
Rua Pastor Rodolfo Beunttenmuller, 415 – Bancários  
CEP 58052-140, João Pessoa, PB, Brasil  
Fone: (83) 235-5091  
E-mail: jozinete.vieira@bol.com.br