

ATIVIDADE *in vitro* DE TINTURA DE ROMÃ (*Punica granatum* L.) CONTRA CEPA PADRÃO DE *Streptococcus pyogenes*

Letícia Zorzanelli Marçal¹, Weverton Vizentini¹, Luciana Camizão Rebello², Sidney Augusto Vieira Filho³, Valdenir José Belinelo⁴

1.Farmacêuticos, Faculdade Pitágoras de Linhares, Linhares, ES

2.Especialista, Professora da Faculdade Pitágoras de Linhares, Linhares, ES,
(lucianadematos@hotmail.com)

3.Doutor, Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de
Ouro Preto, Ouro Preto, MG

4.Doutor, Professor do PPGAT e do Departamento de Ciências da Saúde,
CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES

Data de recebimento: 07/10/2011 - Data de aprovação: 14/11/2011

RESUMO

No Brasil é comum a utilização de plantas medicinais e meios fitoterápicos com o objetivo de curar diversas patologias. Em relação às faringites, um fitoterápico alternativo bastante utilizado é o fruto da romãzeira (*Punica granatum* L.). O objetivo do presente trabalho envolveu a avaliação *in vitro* da atividade da tintura de romã, comercial, contra a bactéria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Foram analisadas amostras de três marcas comerciais de tintura de romã, adquiridas em diferentes farmácias da cidade de Linhares, ES. Em comparação com a penicilina (10,0 µg), usada como antibiótico padrão positivo, não foi detectado halos de inibição do crescimento induzido pela tintura, na concentração de 20% (m/v). Este resultado demonstrou a não efetividade da tintura de romã contra a bactéria *S. pyogenes* ATCC 19615. O resultado deste trabalho disponibilizou informação técnica sobre as tinturas de romã que vêm sendo comercializadas e utilizadas no tratamento da faringite estreptocócica.

PALAVRAS-CHAVE: Tintura de romã, *Punica granatum*, *Streptococcus pyogenes*

In vitro* ACTIVITY OF TINCTURE OF POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) AGAINST STANDARD STRAIN OF *Streptococcus pyogenes

ABSTRACT

In Brazil it is common the use of medicinal plants and phytotherapeutics in the treatment of various diseases. In relation to the pharyngitis, an alternative phytotherapeutic is the fruit of the pomegranate (*Punica granatum* L.). The objective of this work involved an *in vitro* evaluation of the activity of commercial pomegranate

tincture against the bacteria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, through the Kirby-bauer disk diffusion method. Three commercial samples of pomegranate tincture were acquired from different pharmacies of the Linhares city, ES. Compared with the results obtained with penicillin (10.0 µg), used as standard positive antibiotic, was not detected inhibition halos induced by the tincture, at 20% (m/v) concentration. This result demonstrated the non-effectiveness of the pomegranate tincture antibacterial action against the bacteria *S. pyogenes* ATCC 19615. The result of this work provided technical information seeing about the pomegranate tinctures are being commercialized and used in the treatment of streptococcal pharyngitis.

KEYWORDS: Pomegranate tincture, *Punica granatum*, *Streptococcus pyogenes*

INTRODUÇÃO

Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004). No contexto etnográfico mundial, destaca-se a romã, fruto da *Punica granatum* L. (romãzeira), espécie pertencente à família Lythraceae, que é usada, sob diferentes formas de preparação, no tratamento de processos infecciosos internos e externos.

Em relação às faringites, a situação etnofarmacológica é análoga, e é possível observar que um fitoterápico alternativo muito utilizado envolve o uso de frutos da romãzeira (*Punica granatum* L.) (TAUFNER et al., 2006)

A faringite estreptocócica aguda é uma infecção causada por *Streptococcus pyogenes*, que ocorre principalmente em épocas mais frias do ano. É uma doença contagiosa, onde a bactéria é facilmente transmitida por contato direto (TORTORA et al., 2006; SCALABRIN et al., 2003; BISNO et al., 2002), É importante que a faringite seja adequadamente tratada para se prevenir a ocorrência subsequente de febre reumática aguda e possíveis complicações supurativas (SCALABRIN et al., 2003).

Trabalhos publicados por BRAGA et al. (2005) e MACHADO et al. (2003) relatam a eficácia de extratos de *P. granatum* contra cepas de *S. aureus*, numa relação dose-dependente. AHMAD & BEG (2001) determinaram que o extrato alcoólico da casca de *P. granatum* foi efetivo, contra o fungo *Candida albicans*, e seus resultados indicaram que a resistência a agentes antimicrobianos sintéticos não interfere na ação antimicrobiana de substâncias obtida a partir de plantas, provavelmente em decorrência de diferentes modos de ação.

Entre os estudos desenvolvidos em relação às propriedades medicinais da romãzeira, em 2005 foi publicado um estudo sobre a atividade antimicrobiana da *Punica granatum* L que demonstrou inibição do crescimento de cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27583 no entanto, não foi testado em cepas de *Streptococcus pyogenes* (MICHELIN et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho envolveu uma avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de tinturas de romã (*Punica Granatum* L.), comercializadas no município de Linhares, ES, contra a bactéria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo longitudinal de intervenção controlada, no qual as tinturas de romã utilizadas foram adquiridas em farmácias da cidade de Linhares, ES, no total de 03 amostras na concentração de 20% (m/v), sendo uma escolha aleatória, e identificada como A, B e C, objetivando a manutenção do sigilo de seus fabricantes. Foi utilizada a cepa da bactéria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (CEFAR[®]). A atividade antimicrobiana das amostras de tintura de romã comercial foi realizada em triplicata, através do método de difusão em disco, conforme descrito por Kirby-Bauer (ESTEVAM et al., 2009). A análise foi repetida para confirmação, seguindo o mesmo método. O meio de cultura utilizado foi o agar Mueller Hinton (Acumédia[®]) acrescido de sangue de carneiro a 5%. Para a identificação do microrganismo, foi utilizado o teste de sensibilidade à bacitracina, coloração em Gram e prova da catalase.

Os discos utilizados foram preparados com tamanho de 0,6 mm e embebidos com 10,0 µL da tintura em análise. Em seguida, os discos umedecidos foram distribuídos em dois grupos, discos úmidos e discos secos (obtidos após secagem em estufa a 40 °C). Os discos foram dispostos nas placas já semeadas com a bactéria *Streptococcus pyogenes*, sendo que cada placa continha quatro discos, três correspondentes às tinturas e um correspondente à penicilina G (10,0 µg), usada como antibiótico padrão positivo.

As placas inoculadas com *Streptococcus pyogenes* e contendo os discos foram invertidas e incubadas em estufa a 35 °C, sob atmosfera de CO₂ durante 24 horas e, em seguida, os halos de inibição foram medidos segundo metodologia proposta por CARDOSO (2009). Placas contendo somente meio de cultivo, para controle da ausência de crescimento microbiano, e placas inoculadas com *Streptococcus pyogenes*, para controle negativo, foram incubadas nas mesmas condições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como esperado, o antibiótico comercial penicilina G (10,0 µg), utilizado como padrão positivo, induziu a formação de halos de inibição do crescimento de *Streptococcus pyogenes*. De acordo com Tabela padrão de interpretação do diâmetro do halo de inibição (CEFAR, 2011), o halo de inibição do crescimento de cepas selvagens de *S. pyogenes* induzido pela penicilina G, deve ser igual ou superior a 24 mm, para classificar essa bactéria como sensível. Nos testes realizados neste experimento obteve-se média de halo de inibição de 24,5mm, o que classificou a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 como sendo sensível a penicilina G (10,0 µg) (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados da atividade das tinturas de romã comercial (A, B e C) contra *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Teste 1 Seco		Teste 2 Seco	
A	R (sem halo)	A	R (sem halo)
B	R (sem halo)	B	R (sem halo)
C	R (sem halo)	C	R (sem halo)
Penicilina G 10 µg	S (24,5 mm)	Penicilina G 10 µg	S (24 mm)
Teste 1 Úmido		Teste 2 Úmido	
A	R (sem halo)	A	R (sem halo)
B	R (sem halo)	B	R (sem halo)
C	R (sem halo)	C	R (sem halo)
Penicilina G 10 µg	S (25 mm)	Penicilina G 10 µg	S (24,5 mm)

R = Resistente (sem formação de halo ou halo menor que o requerido por tabela); S = Sensível (média do halo de inibição, em milímetros)

Estes resultados demonstraram que a penicilina continua sendo um agente antibacteriano eficaz, já que o mesmo apresentou efetiva inibição do crescimento do *S. pyogenes* o que está de acordo com estudos de BISNO (2001).

Nos experimentos utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer, não foram detectados halos de inibição do crescimento da bactéria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, induzidos pelas amostras de tinturas de romã comerciais (A, B e C),

Na execução dos testes, foram realizadas duas técnicas que envolveram discos das tinturas de romã secos e úmidos. Para ambas as situações não foram detectados halos de inibição do crescimento bacteriano, o que demonstrou a não influencia do aquecimento utilizado no processo de secagem.

Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos com as tinturas de romã e com o antibiótico padrão, foi possível inferir que o halo de inibição formado pela penicilina G determinou a sensibilidade do *S. pyogenes*, o que está de acordo com SCALABRIN et al. (2003). Este resultado comprovou a aplicação correta do método já que o halo de inibição de penicilina G (10,0 µg) está de acordo com dados da literatura (BISNO, 2002).

Em relação às amostras de tinturas de romã não foi detectada a formação de halos de inibição do crescimento de *S. pyogenes*. Não foram encontrados relatos na literatura demonstrando a ação da romã sobre *S. pyogenes*. Por outro lado, existem estudos sobre uma efetiva ação antimicrobiana quando se utiliza o extrato de romã. Em trabalho publicado por PEREIRA et al. (2004), foi demonstrada a sensibilidade de *Streptococcus mitis*, *S. mutans* e o *S. sanguis*, frente ao extrato hidroalcoólico de romã (*P. granatum* L.). Estas três espécies de bactérias, do mesmo gênero da *S. pyogenes*, são responsáveis pela formação de placa supragengival e consideradas como potenciais agentes cariogênicos. PEREIRA et al. (2006) também avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de *P. granatum* sobre microrganismos do biofilme dental e constataram a eficácia do extrato de romã sobre a linhagem de *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sabinis* e *Lactobaccillus casei*. Todas as cepas mostraram serem sensíveis frente ao extrato hidroalcoólico de *P. granatum*. Foram observados halos de inibição de 10 a 25 mm, sendo considerados

ativos os extratos que produziram halos de inibição superior a 15 mm. Estes resultados estão em concordância com o trabalho de PRASHANTH et al. (2001), que em testes com o extrato de romã evidenciou a sua capacidade de inibição do crescimento de bactérias Gram positivas, mais especificamente o de *Staphylococcus aureus*.

O resultado deste estudo demonstrou a não efetividade da ação antimicrobiana de tintura de romã na inibição do crescimento de cepa padrão de *S. pyogenes*.

Corroborando com os resultados do presente trabalho, SALGADO et al. (2006) estudando *in vivo* a ação do gel de romã à 10%, e sua ação sobre a formação da placa bacteriana supragengival e gengivite, concluíram que o gel contendo extrato de romã, não foi eficiente.

CONCLUSÕES

O resultado deste estudo demonstrou que as amostras de tintura de romã, na concentração de 20% (m/v), comercializadas em Linhares, ES, não apresentam atividade antibacteriana frente à *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 113-123, 2001.

BISNO, A. L.; GERBER, M. A.; GWALTNEY JR, J. M.; KAPLAN, E. L.; SCHWARTZ, R. H. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 113-125, 2002.

BISNO, A. L. Primare care: acute pharyngitis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p.1-13, 2001;

BRAGA, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J. A.; CARMO, L. S.; CHARTONE-SOUZA, E. ; NASCIMENTO, A. M. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 335-339, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução de Diretoria Colegiada nº. 48 de 16 de março de 2004. **Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária**. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

CARDOSO, D. B.; SABINO, H. M.; GILIO, A. E.; MACHADO, B. M.; LOTUFO, J. P. B.; PASSADORE, L. F.; MARTINEZ, M. B. Faringoamigdalite estreptocócica: comparação entre diagnóstico clínico e microbiológico. **Jornal de Pediatria**, v. 31, n. 2, p. 94-99, 2009.

CEFAR. **SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR**[®] - discos para antibiograma. Disponível em: <<http://www.cefap.com.br/download/Bula%20Sensifar-Multifar3.pdf>>. Acesso em 04 Abr. 2011.

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, É. V. F.; ARAÚJO NETO, V.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fotoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart, (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 299-303, 2009.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

PEREIRA, E. R. T.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigação do potencial quimioprotetor da *Punica granatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 168-171, 2004

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n.1, p. 91-92, 2006.

PRASHANTH, D.; ASHA, M. K.; AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 171-173, 2001.

SALGADO, A. D. Y.; MAIA, J. L.; PEREIRA, S. L. S.; LEMOS, T. L. G.; MOTA, O. M. L. Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing *Punica granatum* L. extract. A doubleblind clinical study in humans. **Journal Applied Oral Science**, v. 14, n. 3, p. 162-166, 2006.

SCALABRIN, R.; BUSS, G. D.; IAMAGUCHI, K. C. S.; CARDOSO, C. L.; GARCIA, L. B. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 6, p. 814-818, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CHRISTINE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 323p.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Tereza e Marilândia - ES. **Natureza online**, v. 4, n. 1, p. 30-39, 2006.