

IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FITOTERÁPICOS SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) E *Escherichia coli* (ATCC 11303)

IDENTIFICATION OF ANTIMICROBIAL PHYTOTHERAPY ACTIVITY ON *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) AND *Escherichia coli* (ATCC 11303)

KELVIN ALVES NAZARÉ¹, LORRAN MIRANDA ANDRADE DE FREITAS^{2*}

1. Acadêmico de Graduação em Biomedicina da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G; 2. Professor Doutor, Docente nas disciplinas de Citogenética, Bioquímica Básica e Bioquímica Clínica do curso de Biomedicina da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G.

* Rua Flávio Fraga França, 690, João XXIII, Muriaé, Minas Gerais, Brasil. CEP: 36883-217. lorranmiranda@hotmail.com

Recebido em 23/09/2020. Aceito para publicação em 28/10/2020

RESUMO

Os fitoterápicos são empregados para diversos fins terapêuticos há séculos. Atualmente, a necessidade de novas opções terapêuticas para o combate de bactérias multirresistentes corrobora para a identificação de plantas medicinais com essa propriedade. Dentre as plantas reconhecidas como detentoras da atividade antimicrobiana estão: Calêndula (*Calêndula officinalis*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Terramicina (*Alternanthera brasiliana*), Dente de leão (*Taraxacum officinale*) e a Romã (*Punica granatum*). Para a realização dos testes, todas as plantas foram obtidas liofilizadas, dissecadas à vácuo, sendo trituradas e realizada extração alcóolica e aquosa por infusão. Os extratos foram testados contra as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11303). Contra a cepa de *Staphylococcus aureus* o extrato alcóolico da casca da romã apresentou maior atividade antimicrobiana, com halos inibitórios em média de 19,33 mm, enquanto o extrato aquoso apresentou uma média de 18,33 mm de halo inibitorio. Contra a *Escherichia coli* não houve atividade antimicrobiana, apesar de ser descrita na literatura. As demais plantas utilizadas nesse experimento não apresentaram halos de inibição contra as cepas. Os resultados apresentados comprovam a capacidade de inibição bacteriana da Romã, que vem sido descrito com potencial de baixo custo que pode auxiliar no controle de microorganismos, especialmente *Staphylococcus aureus*.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterápicos, antimicrobiana, terapêuticos.

ABSTRACT

Herbal medicines have been used for different therapeutic purposes for centuries. Currently, the need for new therapeutic options to combat multidrug-resistant bacteria corroborates the identification of medicinal plants with this property. Among the plants recognized as having antimicrobial activity are: Marigold (*Calendula officinalis*), Artichoke (*Cynara scolymus*), Terramycin (*Alternanthera brasiliana*), Dandelion (*Taraxacum officinale*) and Peel of Pomegranate (*Punica granatum*). To perform the tests, all plants were obtained lyophilized, dissected under vacuum, being crushed and the alcoholic and aqueous extraction by infusion was performed. The extracts were tested against the strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and

Escherichia coli (ATCC 11303). Against the *Staphylococcus aureus* strain, the alcoholic extract of the pomegranate peel showed greater antimicrobial activity, with inhibitory halos on average of 19.33 mm, while the aqueous extract showed an average of 18.33 mm of inhibitory halo. Against *Escherichia coli* there was no antimicrobial activity, despite being described in the literature. The other plants used in this experiment did not show inhibition halos against the strains. The results presented prove the capacity of bacterial inhibition of Pomegranate, which has been described with low cost potential that can help in the control of microorganisms, especially *Staphylococcus aureus*.

KEYWORDS: Phytotherapics, antimicrobial, therapeutic.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática que dura milhares de anos, no entanto, esta possui uma fonte de conhecimento empírico acumulado¹. Segundo a OMS, 85% das pessoas do mundo utilizam fitoterápicos. Nos últimos anos ocorreu um crescente interesse na exploração de fitoterápicos tradicionais com intuito de contribuir, através de investigações químicas e biológicas no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de diversas patologias². Sendo assim, a aceitação e emprego desses fitoterápicos têm aumentado expressivamente³.

A inclusão da fitoterapia no SUS ocorreu com a implantação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em 2006. A utilização da fitoterapia na assistência básica à saúde tornou-se parte fundamental no tratamento de diversas patologias, auxiliando ou mesmo substituindo o tratamento alopático em casos específicos⁴.

Dentre as vantagens do seu uso destacam-se o baixo custo, fácil acesso e poucos efeitos colaterais se comparados aos alopáticos. Uma vez que geralmente não são necessárias altas dosagens para a ação terapêutica esperada, por se tratar de um fitocomplexo, ao invés de uma substância isolada, necessitando esta de uma dosagem maior em sua maioria⁵.

Concomitantemente, a busca por novos agentes antimicrobianos é constante, devido ao uso

indiscriminado de antibióticos ocorreu uma evolução e adaptação desses microrganismos aos antimicrobianos alopatóicos, sendo necessárias novas opções terapêuticas para seu combate. Além disto, a crescente demanda de alimentos, a severidade das pragas e os malefícios causados pelo uso de agrotóxicos à saúde humana contribuem para o interesse na utilização de fitoterápicos na qualidade sanitária das sementes⁶. Devido algumas espécies sofrerem lesões e deterioração em maior escala por fitopatógenos, a busca por fito protetores tem sido constante⁷.

A exemplo disto, estudos realizados por Nicareta (2019)⁸, demonstraram a atividade antimicrobiana da Terramicina (*Alternanthera brasiliana*) destacando sua ação fungicida, sendo tal característica associada à presença de terpenóides e flavonoides em sua estrutura. Também conhecida como Pépetua-do-mato, a Terramicina é largamente encontrada no Brasil.

Outra espécie com atividade fungitóxica é a Alcachofra (*Cynara scolymus*), seus extratos aquosos apresentaram potencial capaz de reduzir a quantidade de fitopatógenos em sementes. Originária do Mediterrâneo, esta planta foi intensamente utilizada pelos médicos medievais. A semelhança dos espinhos com os dentes de cachorro, explicam o nome dado ao seu gênero, *Cynara* que no latim significa canina⁷.

De origem europeia e utilizada desde o século X, o Dente de Leão (*Taraxacum officinale*) é muito disseminado no Brasil, sendo largamente utilizado como diurético. Sua aplicação na medicina tradicional é amplamente descrita como antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, além da utilização da infusão ou xarope de suas folhas para tratar infecções do trato respiratório. No entanto, assim como as demais plantas deste estudo, existe a necessidade de comprovação científica sobre sua eficácia e a relação dosagem terapêutica e toxicidade⁹.

Outra espécie vegetal que se destaca é a Calêndula (*Calendula officinalis*), popularmente conhecida como Margarida, têm demonstrado ser uma eficaz opção terapêutica no tratamento de infecções do trato oral. PINHEIRO *et al* (2012)¹⁰ relatou em seus estudos a presença de halos de inibição de 12,33 mm frente ao *Streptococcus mutans*. Outras atividades biológicas também são associadas à Calêndula, principalmente no tecido tegumentar¹¹, Baranov (1999)¹² em um estudo randomizado controlado relatou que a aplicação de calêndula potencializou o tratamento de queimaduras de 2º e 3º graus.

Já a Romã (*Punica Granatum*) conhecida por tratar sintomas e doenças como infecções de garganta, é uma espécie originária do Oriente Médio e amplamente encontrada no Brasil¹². Sua análise fitoquímica apresentou até 28% de taninos gálicos na casca do caule e do fruto. Dentre seus principais fito constituintes estão os flavonoides (apigenina e narigenina)¹³, alcalóides, antocianinas, ácido ascórbico, taninos (ácidos gálico e elágico), ácidos graxos conjugados (ácido púnicico) e o ácido ursólico¹⁴.

Tais moléculas são derivadas do metabolismo

secundário e não possuem uma distribuição universal, apesar de serem importantes na interação com o meio ambiente, não são necessárias a todas as espécies¹⁵. Deste modo, exercem papel fundamental contra a herbivoria, ataque de patógenos, atração de organismos benéficos como polinizadores ou microrganismos simbiotes, e até mesmo na competição entre plantas¹⁶.

De tal forma, todas as espécies descritas são reconhecidas por serem detentoras da atividade antimicrobiana, sugerindo a necessidade de determinar através de novos testes sobre quais microrganismos sua atividade é validada, uma vez que a maioria possui atividade relatada frente a fungos e fitopatógenos não específicos.

Neste contexto, um microrganismo de grande relevância para a clínica médica é o *Staphylococcus aureus*, microrganismo gram-positivo e considerado o mais virulento do seu gênero, pode provocar desde de simples afecções como espinhas e furúnculos até infecções mais graves como síndrome do choque tóxico, meningite e pericardite¹⁷.

Os *Staphylococcus aureus* são capazes de desenvolver fatores de virulência e estratégias como proteínas de membrana, enzimas e toxinas que permitem escapar do sistema imune¹⁸. Embora seja encontrado em sítios anatômicos de pessoas saudáveis, como as mãos e a cavidade nasal, este microrganismo possui ao longo de seu histórico uma alta capacidade de adaptação e evolução frente aos antibióticos. É considerado altamente patogênico, causando infecções mais graves, sobretudo em pacientes que possuem uma doença base grave, como diabetes, ou alterações no sistema imunológico¹⁹.

Outro microrganismo com grande importância clínica é a *Escherichia coli*, bactéria gram negativa e pertencente a família Enterobacteriaceae, é amplamente encontrada no trato intestinal onde habita de forma comensal. Sua capacidade patogênica ocorre na maioria dos casos ao migrar-se para outros sítios anatômicos, como por exemplo, o trato urinário²⁰. Este microrganismo é considerado o principal agente etiológico de infecções do trato urinário, além de ser largamente encontrada em surtos por infecção alimentar²¹.

Diante das informações expostas, considerando a escassez de estudos relatando tal atividade contra microrganismos potencialmente patogênicos para a espécie humana, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos por infusão e alcoólicos da Calêndula (*Calendula officinalis*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Terramicina (*Alternanthera brasiliana*), Dente de leão (*Taraxacum officinale*) e casca da Romã (*Punica granatum*) sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11303).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e obtenção das plantas

Por meio de uma leitura criteriosa de artigos científicos, foram selecionadas cinco plantas descritas

como detentoras da atividade antimicrobiana, sendo elas: Calêndula (*Calêndula officinalis*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Terramicina (*Alternanthera brasiliana*), Dente de leão (*Taraxacum officinale*) e casca da romã (*Punica granatum*). Todas as plantas foram obtidas liofilizadas em mercado especializado.

Preparação dos materiais

Todas as plantas foram trituradas em um processador e dissecadas à vácuo. Após foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e identificadas. Para a confecção dos discos de antibiograma foi utilizado papel filtro estéril medindo 3,5mm de raio, e submetidos à imersão em álcool 70%, sendo posteriormente secos em temperatura ambiente.

Confecção dos extratos

Para a confecção dos extratos foi padronizada a concentração de 10 ml/g para a extração aquosa por infusão e alcoólica. Com auxílio de balança analítica foi pesado 1g de cada planta, sendo na extração alcoólica submetidos a 10ml de álcool 70%, e na extração aquosa por infusão submetidas a 10ml de água à 100°C, utilizando-se um ebulidor elétrico. Posteriormente, as amostras foram dispostas em um agitador mecânico por 2 horas envoltas com papel alumínio, filtradas com papel filtro estéril, e centrifugadas por 40 segundos à 3000 rpm. Retirado o extrato sobrenadante, foram identificados e armazenados em tubos de ensaio para realização dos testes.

Teste de susceptibilidade

Para a realização do antibiograma utilizou-se discos de papel filtro estéreis contendo 20 µL de extrato por disco e secos em temperatura ambiente. Para testar a atividade antimicrobiana dos extratos foram utilizadas as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11303). As bactérias dispostas em ágar Mueller Hinton foram suspensas em 5 ml de solução fisiológica 0,9% até obter a turvação de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC), e semeadas com swab sobre a superfície das placas com ágar Mueller Hinton. As placas foram identificadas e receberam 4 discos cada (sendo 1 disco com extração alcoólica, 1 disco com extração aquosa por infusão, 1 disco estéril para controle negativo e 1 disco de oxaciclina utilizado para controle positivo). As placas foram colocadas em estufa bacteriológica à 37°C e realizada leitura após 24 horas. Primeiramente foi realizado um screening de todos os extratos, e posteriormente todos os testes foram repetidos em triplicata.

Análise dos resultados

Após 24 horas as placas com os discos foram retiradas da estufa e realizada a leitura. As placas que apresentaram a presença de halos inibitórios foram medidas com auxílio de paquímetro e retirada a média dos resultados obtidos na triplicata. Os halos inibitórios

em torno dos discos foram associados à atividade antimicrobiana dos extratos.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse experimento constataram a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos e aquosos por infusão da casca da Romã sobre a bactéria *S. aureus*, e se apresentarem ineficazes sobre a bactéria *E. coli*. Todas as demais plantas não apresentaram halo de inibição contra nenhuma cepa testada. As medidas dos halos inibitórios dos extratos da casca da Romã (*Punica granatum*) são indicados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro dos halos inibitórios dos extratos alcoólicos e aquosos por infusão da Romã frente ao microorganismo *S. aureus*, em triplicata.

Extração	Concentração dos Extratos	<i>S. aureus</i>	Média dos halos
Aquosa por infusão	20µL	19mm / 18mm / 18mm	18,33mm
Alcoólica	20µL	20mm / 19mm / 19mm.	19,33mm
Oxaciclina (Controle)	-	21mm 19mm 17mm	19mm

Fonte: Os autores.

4. DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de derivados das plantas vem sendo descritas contra diferentes microrganismos. Alguns estudos relatam na literatura científica sobre a ação antimicrobiana de extratos da romã sobre as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* e *Bacillus subtilis*²².

Martins e Casali (2019)²³ descreveram em seus experimentos que o extrato da casca da romã apresentou halos inibitórios contra *S. aureus* de até 16 mm, e de 19,80 mm para *E. coli*, quando utilizadas as concentrações de 10µL, 15µL e 20µL dos extratos. O fato da coleta do material (casca do fruto) ter sido frescas, e haver divergência na cepa utilizada podem ter sido determinantes na atividade inibitória contra *E. coli*, sugerindo uma resistência da cepa de *E. coli* (ATCC 11303) utilizada neste experimento.

De acordo com Oliveira (2016)²⁴, a sensibilidade aos extratos é determinada quando há formação de halos inibitórios que se apresentem iguais ou maiores que 10mm. Com base nisso, os resultados obtidos nesse experimento podem ser validados.

Tavarez (2017)²⁵ descreveu em seu estudo sobre a atividade antimicrobiana da casca da romã sobre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* No entanto, necessitou da dose máxima utilizada em sua metodologia para obter a concentração inibitória mínima sobre *S. aureus*. Sendo assim, a atividade

antimicrobiana da romã sobre *S. aureus* reforça acerca da sua eficiência quanto às infecções das vias superiores, como já é de conhecimento popular a sua utilização para infecções de garganta.

Em seus experimentos, Volpato (2001)²⁶ relatou que a Calêndula (*Calêndula officinalis*) apresentou baixa atividade antibacteriana, sendo os melhores resultados expressos quando testados em bactérias Gram-positivas. Concluíram também que os compostos apolares possuem maior potencial fitoquímico para atuar como antimicrobiano, devido as frações de hexano e de diclorometano demonstrarem maior atividade em seus testes.

Nos estudos de Parente (2009)²⁷, foi constatada uma maior eficácia dos extratos etanólicos e da fração hexânica da Calêndula frente a bactérias Gram positivas em comparação a fração diclorometano. A CIM do extrato etanólico foi de 0,39 mg/ml quando testadas em *S. aureus* (ATCC 13048).

Além disso, Nicareta (2019)⁸, em seus experimentos analisou o potencial antimicrobiano das folhas da Terramicina contra fungos fitopatogênicos, e observou a inibição de até 69% dos microrganismos pelo método de diluição em ágar.

Caetano (2002)²⁸, investigou a atividade antimicrobiana da Terramicina (*Alternanthera brasiliana*), e descreveu sua eficácia contra 4 cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando o extrato bruto na concentração de 65mg/ml. Relatou também que sua atividade foi semelhante ao disco controle de cloridrato de tetraciclina, alcançando halos de inibição de até 34mm.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, observou-se que o diâmetro dos halos inibitórios dos extratos de Romã foi similar ao disco de antibiograma utilizado para controle positivo quando testados em *S. aureus*, o que corrobora para a validação do experimento.

Embora alguns estudos tenham comprovado a atividade antimicrobiana de plantas clássicas como Calêndula, Terramicina, Dente de leão e Alcachofra e de outros extratos, de acordo com a metodologia utilizada somente a Romã (*Punica granatum*) apresentou atividade antimicrobiana, apresentando potencial para auxiliar ou mesmo tratar de infecções causadas por bactérias, especialmente *S. aureus*.

A ineficácia antimicrobiana de plantas clássicas nesse experimento pode ser explicada devido a diferença de concentração utilizada, resistência da cepa bacteriana ou estudos utilizando outros microrganismos, além da ausência de amostra fresca das plantas. Além disso, alguns autores descreveram ausência ou resultados pouco expressivos em bactérias Gram negativas, o que reforça o fato de nenhum extrato ter funcionado contra *E. coli*.

6. AGRADECIMENTOS e FINANCIAMENTO

Agradecemos à FACULDADE ÚNICA DE IPATINGA pelo financiamento de todos os recursos utilizados para a realização deste estudo. A todos os colaboradores, Técnicos dos laboratórios, e especialmente ao Núcleo de Pesquisa e Iniciação Científica (NUPIC) pelo apoio e suporte quando solicitado.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Medeiros ACD, Souza CMP, Brandão D O, *et al.* Use of medicinal plants with antimicrobial activity by users of the Public Health System in Campina Grande - Paraíba, Brazil. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas. 2013; 15(2):188-193.
- [2] Ahameethunisa AR, Hopper W; Antibacterial activity of Artemisia nilagirica leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2010.
- [3] Bibi Y, Nisa S, Chaudhary FM, *et al.* Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011.
- [4] Mattos G, Camargo A, Souza CA, *et al.* Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals. Ciência & Saúde Coletiva. , 2018; 23(11):3735-3744.
- [5] Bruning MCR, Mosegui GGB, Viana CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. Ciência & Saúde Coletiva. 2012; 17(10):2675-2685.
- [6] Veiga MM. Pesticides: economic efficiency and social and environmental injustice. Ciênc. saúde coletiva vol.12 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2007.
- [7] Bernardi C. Caracterização química e potencial biotecnológico do extrato de alcachofra (*Cynara scolymus L.*) no tratamento de sementes. [dissertação] Dois vizinhos: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2020
- [8] Nicareta C, Mazaró SM. Antimicrobial and toxicological potential of *Alternanthera brasiliana*(L.) Kuntze, Amaranthaceae, and the control of phytopathogenic. [tese] Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019.
- [9] Lima KSP. Avaliação da Actividade Antioxidante e Antimutagénica em Diferentes Infusões Medicinais: Barbas de milho, Carqueja, Dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca. [dissertação]: Faculdade de Ciências e tecnologia. 2011.
- [10] Pinheiro MA, Brito DBA, Almeida LFA, *et al.* Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. Rev Bras Promoç Saúde, Fortaleza. 2012; 25(2):197-201.
- [11] Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. Pharmacognosy Reviews. 2013; 7(14):179-87.
- [12] Baranov A. Calendula: How effective is it on burns and scalds. Deutsche Apotheker Zeitung. 1999; 139:61-66.
- [13] Teles DG, Costa MM. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*Plantago major L.*, Plantaginaceae) e Romã (*Punica granatum L.*, Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro. Rev. Bras.Pl. Med., Campinas.

- 2014.
- [14] Nascimento JBJ, Santos AMT, Souza AT, Santos EO, *et al.* Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*); Rev. Bras. Pl. Med., Campinas. 2016.
- [15] Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacog. 2008.
- [16] Barros AM, Ferreira TPS, Mourão DSC, *et al.* Levantamento e uso de plantas medicinais do cerrado tocaninense para o controle alternativo de fitopatógenos. Journal of Biotechnology and Biodiversity. 2019.
- [17] Lima MFP, Borges MA, Parente RS, *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares- Revisão de literatura. Revista Uningá Review. 2015.
- [18] Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. Quím. Nova. 2010.
- [19] Santos DM, Junior ARC, Cutrim BS, *et al.* New experimental approaches to combat infections caused by *Staphylococcus aureus*. Rev. Investig. Bioméd. São Luís. 2018.
- [20] Siqueira MLB, Silva RA, Mendes SO, *et al.* Levantamento de agentes etiológicos associados a infecção urinária e faixa etária das gestantes cadastradas no laboratório central municipal de saúde de Rondonópolis, MT. Biodiversidade. 2019.
- [21] Souza CO, Melo TRB, Melo CSB, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli*: a versatile diarrheagenic category. Rev Pan-Amaz Saude. 2016.
- [22] Souza NCF, Gonzaga LF, Rodriguez JFS, *et al.* Pharmacological properties of *Punica granatum* L (pomegranate): a literature review. Revista Ceuma Perspectivas. 2018.
- [23] Martins FWP, Casali AK. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extracts of Pomegranate (*Punica granatum*, L.) on the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Braz. J. of Develop., Curitiba. 2019.
- [24] Oliveira LML. *Punica granatum*: quantification of extract of polyphenols and potential antifungal against *Candida albicans*. Araçatuba. 2016.
- [25] Tavares LDS. Análise do uso popular e da propriedade antimicrobiana da *Punica Granatum* Linn em Santa Cruz- RN. [monografia] Faculdade de Ciências da Saúde do Traíri, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Santa Cruz. 2017.
- [26] Volpato AMM, Rios EM, Miguel MD, *et al.* Investigação da atividade antibacteriana de calêndula *officinalis* L. (asteraceae). Revista Visão Acadêmica, Curitiba. 2001.
- [27] Parente LML, Silva MSB, Brito LAB, *et al.* Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil; Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 2009.
- [28] Caetano N, Saraiva A, Pereira R, *et al.* Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. Rev. Bras. Farmacogn. 2002.