

Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de sucos de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) sobre cepas de *Escherichia coli* responsáveis por infecção urinária

Evaluation of the antibacterial activity of cranberry juices (Vaccinium macrocarpon) on Escherichia coli strains responsible for urinary infection

Ludmila Pini Simões¹

Louremi Bianchi Gualda de Souza²

Resumo

Objetivo: Analisar o efeito antimicrobiano de sucos de cranberry concentrados, sobre cepas de *Escherichia coli*. **Métodos:** Difusão em disco, difusão em poços e microplaca, utilizando a cepa ATCC 25922 da bactéria *E. coli*. **Resultados:** Os resultados foram comparados com o controle positivo e negativo e dados encontrados na literatura para melhor compreensão da sua possível atividade antibacteriana. O resultado final encontrado foi que o suco de cranberry não tem nenhuma atividade contra o crescimento da cepa de *Escherichia coli* diante dos métodos realizados. **Conclusão:** Não houve atividade antimicrobiana do suco de cranberry sobre cepas de *Escherichia coli*.

Palavras-chave

Vaccinium macrocarpon; *Escherichia coli*; infecções urinárias

INTRODUÇÃO

O presente estudo é de caráter experimental, visando descrever a eficiência da *Vaccinium macrocarpon* sobre o crescimento de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), analisando a possibilidade de sua característica bactericida.

A infecção do trato urinário é uma patologia que consiste na colonização da urina por bactérias e consequente invasão dos tecidos da estrutura do trato urinário. É uma patologia que tem prevalência em todas as populações, porém atinge principalmente o sexo feminino.⁽¹⁾ Aproximadamente 50% a 70% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU em suas vidas, sendo que 20% a 30% destas apresentam episódios recorrentes. No entanto, a real incidência de ITU é provavelmente subestimada, porque pelo menos metade de todas as infecções urinárias se resolve sem atenção médica.⁽²⁾

Do ponto de vista clínico, as infecções do trato urinário (ITUs) são divididas em inferiores, quando atingem somente a bexiga, e superiores, que chegam ao parênquima renal, sendo que a contaminação pode ocorrer por três vias: a via ascendente, que seria a partir da flora fecal e uretral; a via hematogênica, em que a bactéria contamina o sangue e

infecta secundariamente o trato urinário, e, por último, a via linfática.⁽³⁾

O agente etiológico mais comum nas ITUs é a *Escherichia coli*, mas também existem outras bactérias frequentemente isoladas, como *Klebsiella* spp., e outras, como *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus saprofiticus*.⁽³⁾ Segundo Blatt e Miranda (2005),⁽⁴⁾ em pacientes hospitalizados a *E. coli* se apresentou como agente etiológico em 40% dos casos de infecções do trato urinário.

A *E. coli* provoca infecções do trato urinário consideradas mais simples, e sua virulência está ligada a forte adesão de suas fimbrias ao epitélio urinário.⁽⁵⁾ Mulheres se contaminam com maior frequência por apresentarem uretra mais curta e assim ascendência de bactérias à bexiga.⁽⁶⁾

A *E. coli* adquiriu com o passar do tempo grande resistência à maioria dos antibióticos, como as ampicilinas, tetraciclina, estreptomycinas, sulfametoxazoles e carbenicilinas. Ainda que a resistência a antimicrobianos como nitrofurantoína e fluoroquinolonas tenha permanecido baixa, já se tem observado um visível aumento, o que pode ser explicado pelo uso indiscriminado desses antibióticos.⁽⁷⁾

A *Vaccinium macrocarpon*, conhecida popularmente como cranberry, arado-vermelho ou oxicoço, é um fruto

¹Farmacêutica / UniCesumar. Mestranda em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Maringá (URM) – Maringá-PR, Brasil.

²Farmacêutica/UEM e mestre em Ciências de Alimento – Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Londrina-PR, Brasil.

Instituição: Centro Universitário de Maringá – UniCesumar – Maringá-PR, Brasil.

Recebido em 12/06/2018

Artigo aprovado em 27/06/2019

DOI: 10.21877/2448-3877.201900745

pequeno, globoso e vermelho.⁽⁷⁾ É composto por água, alguns ácidos orgânicos, glicose, ácido ascórbico, frutose e proantocianidinas.⁽⁸⁾ Vem sendo utilizado comumente na profilaxia das ITUs, e seu uso está relacionado principalmente a duas atividades dos compostos do fruto: a inibição da aderência das fímbrias da *E. coli* a um dissacarídeo específico da galactose presente nas células uroepiteliais e a acidificação da urina, inibindo o crescimento de patógenos.⁽⁹⁾ Seu uso é profilático e principalmente usado no caso de reinfecções sucessivas, com falhas na antibioticoterapia.⁽⁷⁾

O presente trabalho tem como objetivo analisar o efeito antimicrobiano do suco de cranberry contra *E. coli*. O estudo do efeito antimicrobiano possibilita fundamentar a terapia profilática com cranberry, possibilitando assim uma alternativa ao uso de antimicrobianos, por meio de experimentos microbiológicos testando a cepa *E. coli* com o suco.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o processo de padronização da suspensão bacteriana, utilizou-se como microrganismo de referência a cepa de *Escherichia coli*, ATCC 25922, pura. Em salina estéril, padronizou-se a suspensão bacteriana até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala MacFarland, que corresponde aproximadamente a 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL). Para o teste de microdiluição, essa suspensão foi diluída em salina estéril a 1/10, correspondendo assim a 10⁷UFC/mL.

Sequencialmente utilizou-se o processo de preparo da solução para controle positivo das técnicas, preparando-se uma suspensão de ciprofloxacina 2 mg/mL, sendo diluída 1/100 duas vezes, logo após tendo uma diluição 1/50 em soro fisiológico estéril obtendo-se a concentração de 0,004 µg/mL.

As amostras foram obtidas em uma rede atacadista de alimentos na cidade de Maringá, PR.

Para os testes antibacterianos, utilizaram-se os métodos de difusão Agar I e II, sendo que, para o primeiro, durante a avaliação do suco, foram inseridos 10 µL do mesmo em cada disco, sem realizar diluições. Inoculou-se assepticamente e uniformemente, com o auxílio de *swab*, cepa de *E. coli* (10⁸UFC/mL) em placas com Ágar Muller-Hinton (AMH), sendo inoculados três discos por placa. Para controle também foram submetidos discos dos antimicrobianos ciprofloxacina e sulfametoxazol + trimetopim disponíveis no mercado, em todas as placas, totalizando nove placas de testes. Incubaram-se as placas a 36°C por 24 horas. Após incubação foram realizadas as interpretações dos halos de inibição de crescimento ao redor do disco, medidos em mm, e para o segundo (difusão Ágar II) utilizaram-se nove placas de Ágar Muller-Hinton, inoculan-

do-se cepa de *E. coli* (10 UFC/mL) pela mesma técnica anteriormente descrita. Em seguida, foram perfurados três poços para as placas de avaliação do suco, de aproximadamente 6,0 mm, permitindo um espaço de 30 mm entre cada poço. Volumes fixos do suco (0,1 mL) foram então introduzidos nos orifícios da placa. Em cada placa utilizou-se um poço com ciprofloxacina 0,004 mg/mL como controle positivo, e como controle negativo usou-se salina.

Em seguida, as placas foram deixadas na bancada do laboratório por 40 minutos, para pré-difusão das diluições do suco e do antimicrobiano. Posteriormente foram incubadas a 36°C por 24 horas. A obtenção dos resultados foi realizada através da determinação do halo de inibição de crescimento ao redor do poço, medidos em mm.

O método em microplaca, onde aos orifícios da coluna 1 da linha A ao H foram adicionados 100 mL da solução de ciprofloxacina 0,004 mg/mL + meio de cultura Muller-Hinton, apresentou controle positivo. Para o controle negativo foi usado somente meio de cultura Muller-Hinton + salina estéril. Para o teste com o suco pronto para o consumo, adicionaram-se 100 mL em todos os orifícios nas colunas 3 a 11, da linha A à H, sem realizar diluições, sendo que nas colunas 3, 4 e 5 foi utilizado o suco 1; nas colunas 6, 7 e 8 o suco 2; e nas colunas 9, 10 e 11 o suco 3.

RESULTADOS

Para os métodos testados, pode-se observar que na difusão em Ágar I, nenhuma das três amostras de suco testadas apresentou efeito significativo sobre o crescimento bacteriano, visto que não houve formação de halo inibitório, demonstrando inatividade sobre a bactéria testada. O teste foi validado, uma vez que os controles positivos apresentaram efeito satisfatório sobre a cepa utilizada; da mesma forma, o controle negativo não demonstrou atividade alguma.

Em mesma análise, considerando a metodologia utilizada na difusão Ágar II, sua interpretação foi de que o crescimento bacteriano sem formação de halo inibitório em torno dos poços contendo as amostras testadas indica ausência de atividade antimicrobiana, dado que o controle positivo apresentou halo de inibição sobre o crescimento bacteriano.

Por fim, o método em microplaca indicou que o suco da fruta cranberry não tem nenhuma atividade antibacteriana, pois nos poços onde foram colocadas as três amostras de suco houve turvação e precipitação indicando crescimento bacteriano. O teste foi validado visto que o controle positivo não turvou e o branco também não indicou ausência de contaminação.

Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que, através dos métodos de difusão em Ágar e diluição em microplaca, foi possível observar ausência de atividade

de antibacteriana do suco do fruto *Vaccinium macrocarpon* (cranberry), sobre a cepa de *E. coli* ATCC 25922, pois não houve a formação de halo de inibição em nenhum dos três sucos testados, e também houve turvação nos sucos na diluição da microplaca indicando crescimento bacteriano.

DISCUSSÃO

Outro estudo em andamento na Universidade da Califórnia apresentou dados preliminares que sugerem que o suco de cranberry tem alguma atividade antibacteriana, através de uma preparação cinco vezes mais concentrada que o suco comercialmente disponível, mostrando que o cranberry pode ter, sim, ação inibitória além da profilática já demonstrada.⁽⁶⁾

Em outro estudo observa-se a atividade da cranberry frente a *E. coli* e outras bactérias, porém, observa-se que o método utilizado *in vitro*, diferencia-se a fim de observar a diminuição dos fatores de virulência da bactéria, assim como a execução de um método *in vivo*. Além destas diferenças, observa-se a dose-dependência do efeito do cranberry, a qual foi testada em mais de uma concentração e forma comercial.⁽¹⁰⁾

Fundamenta-se a utilização do cranberry como medida profilática ao aumento da incidência de infecções do trato urinário, principalmente em indivíduos do sexo feminino, através de estudos que comprovam a atividade de seus metabólitos inibindo a adesão da *E. coli* uropatogênica ao tecido uroepitelial, atividade esta relacionada principalmente as proantocianidinas presentes no cranberry.^(10,11)

CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados neste e em outros estudos podemos considerar que o cranberry apresenta ação sobre a virulência da *E. coli*, porém, neste estudo não apresentou atividade bacteriostática e bactericida frente à bactéria cultivada em meio de cultura. Entretanto, usando-se concentrações, metodologias e formas comercializadas diferentes em outros estudos, observou-se que o cranberry inibe a adesão da *E. coli* às células uroepiteliais. Para isso a metodologia deveria envolver o fator de adesão às células e considerar a variabilidade biológica.

Abstract

Objective: Within this context the aim of this study was to analyze the antimicrobial effect of concentrated cranberry juice, on *Escherichia coli*.

Methods: Testing as disk diffusion, diffusion in microplate wells and using the ATCC 25922 strain of *E. coli* bacteria. **Results:** The results were compared with the positive and negative control, and data in the literature, for better understanding of their potential antibacterial activity. The end result was found that cranberry juice has no activity against the

growth of *Escherichia coli* strain before realized methods. **Conclusion:** There was not antimicrobial activity of cranberry juice on strains of *Escherichia coli*.

Keywords

Vaccinium macrocarpon; *Escherichia coli*; urinary infections

REFERÊNCIAS

1. Rangel M, Tressa Y, Zago SS. Infecção urinária do diagnóstico ao tratamento. *Colloquium Vitae*. 2013;5(1):59-67. DOI: 10.5747/cv.2013.v005.n1.v075
2. Azevedo CP, Silva JO. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. *Revista Multidisciplinar de Saúde*, ano IV, n. 7, p. 2-17, 2012.
3. Correia CM, Costa E, Peres AM, Alves M. Etiologia das infecções do trato urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. (2007).
4. Blatt JM, Miranda MC. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. *Rev Panam Infectol*. 2005;7(4):10-4.
5. Jesus TFP. O mirtilo e suas propriedades terapêuticas. Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. 2013. Artigo disponível em: <http://hdl.handle.net/10284/3970>.
6. Hisano M, Bruschini H, Nicodemo AC, Srougi M. Cranberries and lower urinary tract infection prevention. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67(6):661-8.
7. Korb A, Nazareno ER, Mendonça FA, Dalsenter PR. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Rev Biol Ciênc Terra*. 2013;13(1):72-9.
8. Pina A, Figueiredo AR, Campos A, Ferreira CP, Lopes I, Alves NF, et al. Arando na profilaxia das infecções urinárias recorrentes: revisão baseada na evidência. *Rev Port Clin Geral*. 2011;27(5):452-457.
9. Raz R, Chazan B, Dan M. Cranberry juice and urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2004 May 15;38(10):1413-9.
10. Lavigne JP, Bourg G, Combescure C, Botto H, Sotto A. In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Apr;14(4):350-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01917.x
11. De Llano DG, Esteban-Fernández A, Sánchez-Patán F, Martín Ivarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. Anti-Adhesive Activity of Cranberry Phenolic Compounds and Their Microbial-Derived Metabolites against Uropathogenic *Escherichia coli* in Bladder Epithelial Cell Cultures. *Int J Mol Sci*. 2015 May 27;16(6):12119-30. doi: 10.3390/ijms160612119.

Correspondência

Ludmila Pini Simões

Av. Guedner, nº 1610 - Jardim Aclimação
Maringá - PR, Brasil