

## ANÁLISE *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO EXTRATO DE CRANBERRY (*VACCINIUM MACROCARPON*) SOBRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Ana Maria da Silva Batista<sup>1</sup>, Bruna Maiara Almeida Nogueira<sup>2</sup>, Jean Carlos Machado da Costa<sup>3</sup>, Katia Fialho do Nascimento<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia, Campus Curitiba /PR, Universidade Cesumar- UNICESUMAR.  
ana\_batista25\_janeiro@hotmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia, Campus Curitiba /PR, Universidade Cesumar- UNICESUMAR. bruna\_maiara94@hotmail.com

<sup>3</sup>Orientadora, Doutor, docente da Unicesumar, Campus Curitiba /PR, Universidade Cesumar- UNICESUMAR.  
jean.costa@unicesumar.edu.br

<sup>4</sup>Co-orientadora, Doutora, docente da Unicesumar, Campus Curitiba /PR, Universidade Cesumar- UNICESUMAR.  
kátia.nascimento@unicesumar.edu.br

### RESUMO

Objetivo do presente trabalho foi analisar a capacidade antibacteriana do extrato seco de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) sobre cepa a *Escherichia coli*. E os objetivos específicos, enunciar a ação das doses mínima e máximas indicadas e da dose considerada tóxica ao ser humano do extrato de arando oxicoço sobre cepa a *E. coli*; analisando no tempo 0, 24 e 72 horas a ação do cranberry sobre a placa de cultivo com *Escherichia coli*; estimando a viabilidade celular e a proliferação celular na presença do extrato de cranberry. A pesquisa conta com um método experimental, *in vitro*, foi realizado nos laboratórios da Unicesumar campus de Curitiba, após o crescimento das bactérias *E. coli* nas placas, foi tratada com 300mg, 800mg e 2400mg de cranberry e feito os grupos controles. Para observação e contagem, foi utilizado coloração de Gram e câmera de Neubauer, respectivamente. Observou-se que o cranberry na dosagem de 800mg teve uma maior eficácia e nessa dosagem obteve uma maior inibição em comparação ao grupo controle utilizado antibiótico. Na contagem do tratamento de 800mg de cranberry em 24horas inibiu 45,66% e em 72 horas 58,50%, já o antibiótico em 24 horas inibiu 43,82% e em 72 horas 53,48%. Conclui-se que as dosagens de 300 e 800mg foram consideravelmente potentes contra *Escherichia coli*, principalmente quando há a comparação dos testes desses solventes com os controles (controle/ antibiótico; controle/veículo de diluição).

**PALAVRAS-CHAVE:** Potencial antibacteriano; *Escherichia coli*; Cranberry.

### 1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU's) são uma das patologias mais comuns (LUCZAK; SWANOSKI, 2018). A prevalência da infecção é o sexo feminino, afetando 50% das mulheres (LLANO; MORENO-ARRIBAS; BARTOLOMÉ, 2020), sendo que de 10 a 20% apresentará alguma recorrência durante sua vida (AZEVEDO; SILVA, 2012). O motivo dessa predominância seria questões anatômicas, uma vez que a uretra feminina possui menor comprimento quando comparada à do homem, e por conta de sua localização estar próxima ao ânus e da cavidade vaginal (CASTRO *et al.*, 2012).

Para a saúde pública, a infecção do trato urinário constitui um grande gasto, com hospitalização e despesas médicas. O agente etiológico mais recorrente nas ITU's é a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), responsável por cerca de 85% das cistites (LLANO; MORENO-ARRIBAS; BARTOLOMÉ, 2020). É classificada como gram-negativa pela constituição da sua parede celular e é anaeróbica facultativa (MIOTTO *et al.*, 2019). Sua morfologia é em forma de bastonete e sua virulência está intimamente associada com seus anexos de parede celular, como fímbrias e pili que se aderem fortemente no epitélio urinário (SIMÕES; SOUZA, 2019).

Uma das consequências da patologia relatada é o uso de antibióticos de forma irracional, sendo uma realidade em ambulatórios e hospitais, induzindo por fim à resistência bacteriana. A partir disso, novas alternativas não antibióticas de prevenção são interessantes para a saúde pública, como a fitoterapia. A RDC nº 26/2014 no parágrafo II

do artigo 2º afirma, que medicamentos fitoterápicos são obtidos de matérias-primas vegetais, onde sua segurança e eficácia são garantidas em evidências clínicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) tem sido discutido em diversas literaturas e servido de inúmeros testes como opção profilática a ITU. Seu suposto princípio para infecções bacterianas que acometem o trato urinário seria as proantocianidinas (PAC's) tipo A, as quais impediriam a ligação de *E. coli* às estruturas uroepiteliais (HOWEL *et al.*, 2005), ou seja, aconteceria uma interação entre a bactéria e o composto, que evitaria a replicação e colonização do patógeno (LUCZAK; SWANOSKI, 2018) e o açúcar D-manose também teria função na ação preventiva (REVISTA ESSENTIAL, 2018).

O Objetivo geral do presente trabalho é analisar a capacidade antibacteriana do extrato seco de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) sobre cepa *Escherichia coli*. A partir disso também faz parte de nossa meta, os objetivos específicos, como, enunciar a ação das doses mínima e máximas indicadas e da dose considerada tóxica ao ser humano do extrato de arando oxicoco sobre a cepa *E. coli*; analisar no tempo 0, 24 e 72 horas a ação do cranberry sobre a placa de cultivo com *Escherichia coli*; estimar a viabilidade celular e a proliferação celular na presença do extrato de cranberry.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é do tipo experimental, com realização de testes *in vitro* no período de 11 de junho à 1 de julho de 2021 no laboratório de microbiologia e de análises clínicas da UniCesumar, Campus Curitiba. A cepa experimental foi *Escherichia coli* ATCC 25922, doada pelo laboratório da Universidade Federal do Paraná. O meio de cultura foi preparado de acordo com o laboratório indicado: KASVI. O extrato seco de cranberry com 25,16% de proantocianidina foi obtido da empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda. A escolha da indústria, foi com base na determinação do princípio ativo, uma vez que outras não definem a quantidade de PAC's presentes.

Para a preparação da amostra, a *Escherichia coli* foi plaqueada em meio Muller Hinton Agar, foram repicadas em placas de Petri com o mesmo meio de cultura, utilizando a técnica de esgotamento com alça bacteriológica estéril da marca Firstlab. As placas foram incubadas em estufa por 16 dias, em temperatura de 37°C. Após o crescimento das bactérias, as placas foram classificadas segundo o tratamento que seria recebido: **Grupo 1:** controle/ controle; **Grupo 2:** controle/ veículo de diluição (água); **Grupo 3:** 300mg de cranberry (dose mínima); **Grupo 4:** 800mg de cranberry (dose máxima); **Grupo 5:** 2.400mg de cranberry (dose três vezes maior que a máxima, possivelmente tóxica ao ser humano); **Grupo 6:** controle/ amoxicilina (100mg/2mL). A quantidade recebida de tratamento foi de 2mL de solução em todos os procedimentos, em um tempo de 24, 48 e 72 horas. Assim, foi possível realizar a análise macroscópica das colônias, microscópica com coloração de Gram e contagem em microscópio fotônico da marca Opton em câmera de Neubauer.

O extrato de cranberry, foi para cada quadrante das placas, de acordo com a quantidade determinada de 2mL. A diluição foi realizada com solvente específico, água estéril. E após ser diluído em béquer, foi colocado com pipetas estéril nas placas com o inóculo, em cada quadrante. Para calcular a quantidade do extrato diluído em cada dosagem, foi utilizado cálculos de diluição, de modo que a concentração final se mantivesse inalterada e o volume para todas as dosagens finais fosse 2mL (água estéril e extrato de cranberry).

Os testes se iniciaram após estabelecimento da cultura, depois de 16 dias de replicação da *Escherichia coli*. As análises consistiram em: macroscópica (a olho nu); microscópica através de coloração de Gram; e contagem em Câmara de Neubauer, afim de verificar a viabilidade celular e o efeito nocivo na presença do cranberry. Para essa

última análise, onde se quantificou as bactérias mortas junto aos solventes, o preparado analisado foi uma diluição com 900µL de soro fisiológico à 0,9%; 100µL de azul de tripan; e 100µL de amostra. Dessa solução, 10µL foram analisadas em Câmara de Neubauer, contando 16 quadrantes laterais em microscópio óptico com objetiva de 1.000x.

O azul de tripan 0,4%, em solução, foi utilizado para verificar a ação nociva dos tratamentos sobre as células. O material utilizado foi da Gibco, doado pelo laboratório de pesquisa do Pequeno Príncipe.

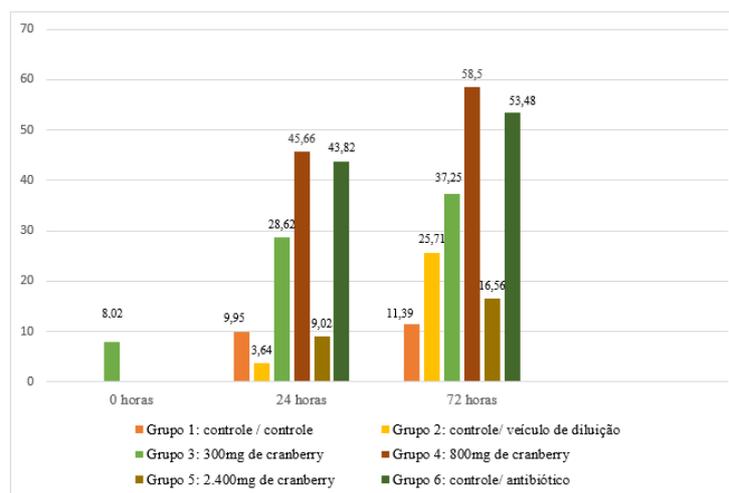
No primeiro dia do teste, foi realizada análise sem adição de substâncias e depois adicionado as respectivas soluções. O tratamento repetiu por 24, 48 e 72 horas, e as análises foram feitas em 24 e 72 horas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com estudos de Souza *et al.* (2016) acerca dos efeitos antimicrobiano do extrato de cranberry sobre micro-organismos causadores de infecção urinária, em especial, a *Escherichia coli*, o cranberry apresentou resultado positivo, exercendo, portanto, efeito de inibição sobre essa bactéria. Assim como em nossos estudos, onde a adição de solução com extrato de cranberry trouxe alterações macroscópicas às estrias com bactérias em comparação às estrias que não receberam tratamentos.

Nos testes realizados, apesar da execução da coloração de Gram, não houve achados significativos de apêndice da bactéria ou qualquer tipo de alteração de parede celular. Entretanto, a partir dessa coloração, confirma-se a análise de bactérias do grupo Gram-negativo.

Para a análise microscópica em Câmara de Neubauer, os resultados obtidos foram decisivos para a conclusão do efeito antibacteriano do *Vaccinium macrocarpon*, quando comparado aos testes controles. Assim, na análise quantitativa do potencial nocivo do extrato de cranberry, houve efeitos positivos, uma vez que a presença da solução após as horas de tratamento trouxe a morte significativa de *Escherichia coli*, como ilustra o gráfico 1:



**Gráfico 1:** Ação nociva do cranberry sobre a *E. coli*.

Outro achado após 3 dias de tratamento, foi observado a presença de grumos de bactérias mortas, no grupo 2, obteve-se 6 grumos; no grupo 3: 4 aglomerados; no controle/controle: 1 grânulo; e controle/antibiótico: 52 aglomerados.

De acordo, com o gráfico 1 foi possível observar que o cranberry teve uma maior eficácia no combate da *E. coli*, no Grupo 4 (800mg), nas análises de 24 horas obteve 45,66% e em 72 horas correspondeu em 58,50% que o cranberry foi efetivo contra as

bactérias. O grupo 4 teve uma maior efetividade que o grupo 5 (2400mg) de cerca de 36,64 % em 24 horas e 41,94% em 72 horas. Comparando o cranberry (grupo 4) com o antibiótico utilizado, podemos observar que o cranberry obteve uma maior eficácia, sendo em 24 horas de tratamento o grupo 4 apresentou 45,66 %, enquanto o antibiótico 43,82%. Em 72 horas o grupo 4 apresentou 58,50% e o antibiótico 53,48% de inibição das bactérias.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas, conclui-se que as dosagens de 300 e 800mg foram consideravelmente potentes contra *Escherichia coli*, principalmente quando há a comparação dos testes desses solventes com os controles.

Contudo, afirma-se que mesmo com esses resultados obtidos, o interessante seria realizar mais análises com dosagens maiores que 800mg, e não apenas a de 2.400mg, uma vez que apesar desta ter maior quantidade de proantocianidinas, não houve uma ação nociva significativa sobre as células quando comparado aos controles e a ação da quantidade máxima e mínima do extrato utilizado. Outra sugestão seria a aplicação dos estudos em cultivo de células epiteliais *in vitro*, para obtenção de resultados mais fidedignos quando comparado a ação da substância *in vivo*.

#### REFERÊNCIAS

AZEVEDO, C. P.; SILVA, J. O. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. **Rev. Multidisciplinar da saúde**, n. 7, p. 1-16, 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Órgão emissor: ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CASTRO, B. G.; PINTO, L. S.; SOUTO, R. C. F. Prevalência de bactérias Gram-positivas em infecção do trato urinário. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, p. 2448-3877, 2019.

LLANO, D. G.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. Cranberry Polyphenols and Prevention against Urinary Tract Infections: Relevant Considerations. **Rev. Molecules**, Espanha, v. 25, n. 3523, p.1-15, aug. 2020.

LUCZAK, T.; SWANOSKI, M. A Review of Cranberry Use for Preventing Urinary Tract Infections in Older Adults. **Rev. The Consultant Pharmacist**. v. 33, n. 8, p. 450-453, aug, 2018.

MIOTTO, M. *et al.* Development and application of a real-time polymerase chain reaction method for quantification of *Escherichia coli* in oysters (*Crassostrea gigas*). **Rev. Food Microbiology**, v. 77, p. 85-92, 2019.

REVISTA ESSENTIA. **Prevenção e tratamento natural da infecção urinária**. Cranberry e D-manose como alternativa ao uso de antibióticos. 12. ed. 2019. 67f.

RISCO, E.; MIGUÉLEZ, C.; BADAJOZ, E. S.; ROUSEAUD, A. Efeito do cranberry americano (Cysticlean) sobre adesão de *Escherichia coli* as células epiteliais da bexiga, estudo *in vitro* e *in vivo*. **Arch Esp Urol**, v. 63, n. 6, p. 422-30, jul./ago 2010.

SIMÕES, L. P.; SOUZA, L. B. G. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de sucos de cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) sobre cepas *Escherichia coli* responsáveis por infecção urinária. **Rev. RBAC**, Maringá, p. 1-5, jun. 2019.

SOUZA, C. F. P. B.; IRINEU, L. E. S. S.; SOUZA, R. S.; PEREIRA, I. S.; TEIXEIRA, R. S.; PEREIRA, C. A. S. Efeito antimicrobiano do extrato de cranberry sobre micro-organismos causadores de infecção urinária. **Cadernos UniFOA**, v. 31; n. 31, p. 113-122, 2016.