

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO DE CRANBERRY EM CEPAS ISOLADAS DE EXAMES DE URINA DE ROTINA NA TERCEIRA IDADE

Melissa Consiglio Monqueiro, Nicole Xagoraris, Matheus Salgado de Oliveira,
Guilherme Teodoro Rodrigues, Sônia Khouri Sibelino.

Universidade do Vale do Paraíba, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José
dos Campos-SP, Brasil, melissa_mel2002@hotmail.com, nicolexago14@gmail.com,
soniak@univap.br.

Resumo

O Cranberry vem sendo estudado como uma possível alternativa no controle de infecção do trato urinário (ITU). Estudos demonstram que a ITU é bastante recorrente em idosos. O objetivo foi analisar amostras de urina, coletadas de pessoas 55+ e pessoas idosas e possíveis alterações no exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS) que apresentassem resultados positivos para urocultura e perfil de sensibilidade dos agentes isolados frente às soluções de cranberry em duas preparações, com concentrações iniciais de 512mg/mL e 128mg/mL, pela metodologia da microdiluição em poços e a técnica da gota, a fim de evidenciar *in vitro* as concentrações inibitória e bactericida mínimas, respectivamente CIM e CBM. Obteve-se 6 uroculturas positivas para *S. epidermidis*, *E. coli* e para *Enterobacter sac.*+. Cerca de 66,6% dos resultados de EAS e de urocultura foram relacionados nos quesitos determinados. Os valores da CBM variaram entre 512mg/mL a 32mg/mL e os valores de CIM entre 256mg/mL a 16mg/mL de cranberry, para ambas as cepas de *E. coli* e de *S. epidermidis*.

Palavras-chave: Infecção do trato urinário. Exames de rotina de urina. Terceira Idade. Fitoterápicos. Cranberry.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A recorrência elevada de ITU (Infecção do Trato Urinário) em pessoas na terceira idade, tanto do sexo masculino quanto do sexo feminino, está relacionada às doenças de base, alterações morfológicas e funcionais da bexiga e também, pela frequente hospitalização com ou sem o uso de sonda vesical (MASSON, *et al.*, 2020). Considerando que as doenças crônicas não transmissíveis são prevalentes nessa população, há uma sobressaliência das infecções do trato urinário como resultado da interação entre virulência bacteriana e fatores biológicos e comportamentais do hospedeiro, visto que, entre os idosos com mais de 65 anos, as ITUs provocam 15,5% das hospitalizações e 6,2% de óbitos, uma vez que, dentre outros fatores clínicos mais relevantes, evidenciou-se que a desidratação dessa população e o comprometimento da musculatura do assoalho pélvico, em mulheres idosas, aumentou em até 40 vezes a chance de desenvolver ITU (SILVA, *et al.*, 2020). Deste modo, a população geriátrica detém maiores possibilidades de contrair infecções no trato urinário em razão de possuir mudanças fisiológicas geradas pelo envelhecimento, sendo elas, a diminuição da capacidade funcional, e consequentemente acrescentado de enfermidades crônicas e debilitantes (CORRÊA, *et al.*, 2010). Um estudo realizado com participantes da terceira idade, exibiu resultados onde houve predominância de ITU e que, em todos os idosos com o diagnóstico da infecção, apresentaram alguma doença, como hipertensão, Diabetes Mellitus, insuficiência renal crônica/aguda dentre outras, além de alguns realizarem uso de sonda vesical associado com fralda (BIZO, *et al.*, 2021).

Diante do exposto, um diagnóstico preciso é essencial para que a terapêutica seja eficaz no prognóstico da infecção. Desta maneira, o diagnóstico da ITU é representado pelo crescimento bacteriano igual ou acima de 10.000 unidades formadoras de colônia por mililitro de urina, preferencialmente de jato médio, com adequada assepsia (MASSON, *et al.*, 2020). A triagem pode ser realizada inicialmente, por meio do exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS), que avalia os aspectos físicos, pela cor, aspecto e depósito da urina, químicos, pela fita reativa e microscópicos, com a contagem de hemácias, leucócitos, células epiteliais, cilindros e cristais. E como

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

método padrão ouro, realiza-se um exame quantitativo do crescimento bacteriano, a urocultura com antibiograma, que tem como princípio o isolamento e identificação dos microrganismos. Em relação a terapêutica mais comum para as ITU, são os antibióticos, entretanto, devido ao seu uso indiscriminado, diversas bactérias patogênicas desenvolveram resistência e o seu uso não tem sido mais tão eficaz. Um estudo mostrou que 82% dos isolados de *E. coli* têm padrão de multirresistência (LOPES, *et al.*, 2019). Os aumentos da taxa de prevalência das ITUs, indicaram o uso irracional de antibióticos na prática clínica e cerca de aproximadamente 80% da administração de antimicrobianos são desnecessários (LOPES, *et al.*, 2019). Com isso, existem estudos que buscam novos tratamentos por meio de terapias complementares com fitoterápicos, que tem se mostrado eficazes (CIMADON, *et al.*, 2021).

O extrato da planta *Vaccinium macrocarpon* conhecido como Cranberry, é utilizado há centenas de anos para conservar alimentos, curar feridas, servir como alimento para os soldados na 2ª Guerra Mundial e para tratar infecções do trato urinário pelos indígenas. O cranberry é composto por componentes fitoquímicos, dentre o mais importante são as PACs, as proantocianidinas, os taninos condensados presentes nas PACs têm a capacidade de inibir a ligação bacteriana em superfícies celulares, bloquear a entrada de agentes patogênicos e diminuir a formação de biofilme. Isso resulta na prevenção da aderência à matriz polimérica e impede a fixação das fimbrias. Consequentemente, essas propriedades tornam as PACs recomendadas para a prevenção e tratamento sintomático de ITUs (LOPES, *et al.*, 2019). O decreto número nº 5.813, de 22 de junho de 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o qual estabelece diretrizes para o acesso e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicas no Brasil. Esse ramo da farmacologia é extremamente amplo e importante para o desenvolvimento de novas terapêuticas (Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 2006). A planta *Vaccinium macrocarpon* está incluída no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, classificada na indicação terapêutica de auxiliar na prevenção e no tratamento sintomático de infecções do trato urinário (LOPES, *et al.*, 2019).

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar as possíveis alterações no exame de EAS, principalmente em relação aos leucócitos, presença de bactérias e nitrito, em amostras de urina que poderão apresentar resultado de urocultura positiva, contagem de colônias igual ou superior à 10.000 UFC/mL e realizar o perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos isolados, *in vitro*, frente à solução fitoterápica de cranberry, em diferentes concentrações, para o controle de bactérias isoladas de quadros de infecções urinárias em pessoas da terceira idade.

Metodologia

O presente estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos - Univap, por meio de um sistema unificado, a Plataforma Brasil. Número do CAAE 69017523.1.0000.5503 e protocolo de envio 040533/2023.

A coleta da amostra foi realizada na Faculdade da Terceira Idade, com os alunos que se encaixavam aos critérios de inclusão, os quais teriam que ser pessoas a partir de 55 anos e pessoas 60+, idosos, alunos da Faculdade da Terceira Idade, que poderiam estar ou não com suspeita de infecção do trato urinário e que estivessem de acordo com o TCLE. As pessoas que estivessem fazendo uso de antibióticos e/ou uso de dispositivo uretral de longa permanência não estariam aptas para participarem do estudo. Logo após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde a urocultura foi realizada primeiramente. A urocultura é um método padrão-ouro, que foi utilizado para confirmar o diagnóstico de ITU. As uroculturas foram processadas pelo método da semeadura por espalhamento, com alça calibrada de 10µl em ágar CLED, ágar MacConkey e ágar Manitol e a incubação da placa na estufa à temperatura de 36°C por 18 a 24 horas. As amostras que apresentaram mais de 10.000 UFC/mL, foram consideradas positivas. Após o isolamento das amostras, somente as que foram positivas, foi realizado o antibiograma manual para testagem da suscetibilidade dos antimicrobianos farmacêuticos comerciais. Além disso, foi executado o exame EAS (Elementos Anormais e Sedimentoscopia) da amostra, a fim de auxiliar na triagem do diagnóstico na suspeita de ITU, o qual foi exercido a parte da fita reativa, através de um equipamento semi automatizado (Lumiratest) para a análise bioquímica como, densidade, pH, proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio, sangue, nitrito e esterase leucocitária. O exame também é composto pela análise física da urina, sendo assim, foi examinada a cor, o aspecto e o depósito.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Além das análises físico-químicas, foi executada a centrifugação da amostra para a realização da avaliação microscópica na K-Cell com base no sedimento urinário. Nessa etapa foi possível efetuar a contagem de hemácias, leucócitos, células tubulares, células epiteliais, se há cilindros, filamentos de muco e cristais. Sendo assim, o exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia demanda a realização da urocultura, a fim de obter a confirmação de microrganismos existentes e provável ITU.

Em seguida da identificação das colônias crescidas na urocultura, o microrganismo foi isolado para ser realizada as testagens do perfil de sensibilidade do cranberry para com as cepas ATCC, sendo *E. coli* (n° 12.241) e *S. epidermidis* (n° 12.228), e clínicas. Os testes foram primeiramente realizados a partir da preparação da solução do cranberry em pó (vendido comercialmente - Cranberry CR Herbarium), onde preparou-se duas soluções com concentrações diferentes, de 128mg/ml e de 512mg/ml, sendo ambas filtradas para um frasco âmbar esterilizado. Para o controle positivo, foi utilizada uma solução manipulada de Ciprofloxacina na concentração de 64µg/mL. Para tal, realizou-se o repique das cepas 24 a 48 horas antes do experimento e, após, foi preparado o inóculo, onde com auxílio de uma alça descartável, uma colônia foi inoculada em 10mL de caldo BHI, seguido de incubação *overnight* (18 horas) a 36°C.

O experimento foi realizado em placa de 96 poços, sendo o poço 1 para o controle positivo (100µl da solução de Ciprofloxacina manipulada mais 5µl do inóculo), poço 2 para o controle negativo (100µl do caldo BHI e 5µl do inóculo). Desta maneira, o próximo poço (poço 3) ocupou a maior concentração da solução, primeiramente, com 200µl. A partir do poço com a maior concentração, o poço de número 4 até o número 10 foi pipetado 100µl de caldo BHI em cada, a fim de ao final da microdiluição obter 100µl em todos os poços. Em seguida, foi pipetado 100µl do poço 3 e transferido para o poço 4, homogeneizado 3 vezes com a pipeta e transferido para o poço 5, assim sucessivamente até o último poço. Após a microdiluição, foi pipetado 5µl do inóculo em todos os poços, para assim, incubar a placa na estufa por 16 a 20 horas (metodologia CLSI, 2018).

Posteriormente ao tempo de incubação, uma alíquota de 5µl das diferentes diluições testadas, foram semeadas em Ágar Müller-Hinton pela técnica da gota e incubado a 37°C por 24h para análise da formação ou ausência das UFC/ml de cada diluição para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima).

Resultados

Entre as 12 amostras coletadas, 6 tiveram cultura positiva, sendo 3 amostras com *Staphylococcus epidermidis*, 2 amostras para *Escherichia coli* e 1 para *Enterobacter sacarose* +. Cerca de 66,6% dos resultados do exame EAS e do exame de urocultura estão relacionados nos quesitos de leucocitúria, nitrito e bacteriúria.

Tabela 1- Amostras que apresentaram urocultura positiva e os respectivos parâmetros do exame EAS

Amostras	Urocultura	Leucócitos	Nitrito	Bacteriúria
02	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16.000/mL	Negativo	Aumentada
03	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20.000/mL	Positivo	Aumentada
05	<i>Enterobacter sacarose</i> +	163.000/mL	Positivo	Aumentada
07	<i>Escherichia coli</i>	15.000/mL	Negativo	Aumentada
10	<i>Escherichia coli</i>	0/mL	Positivo	Aumentada
12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0/mL	Negativo	Aumentada

Fonte: Os autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 2 - Resultados da CBM (Concentração Bactericida Mínima) e da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do perfil de sensibilidade do cranberry para com as cepas ATCC e clínica de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*.

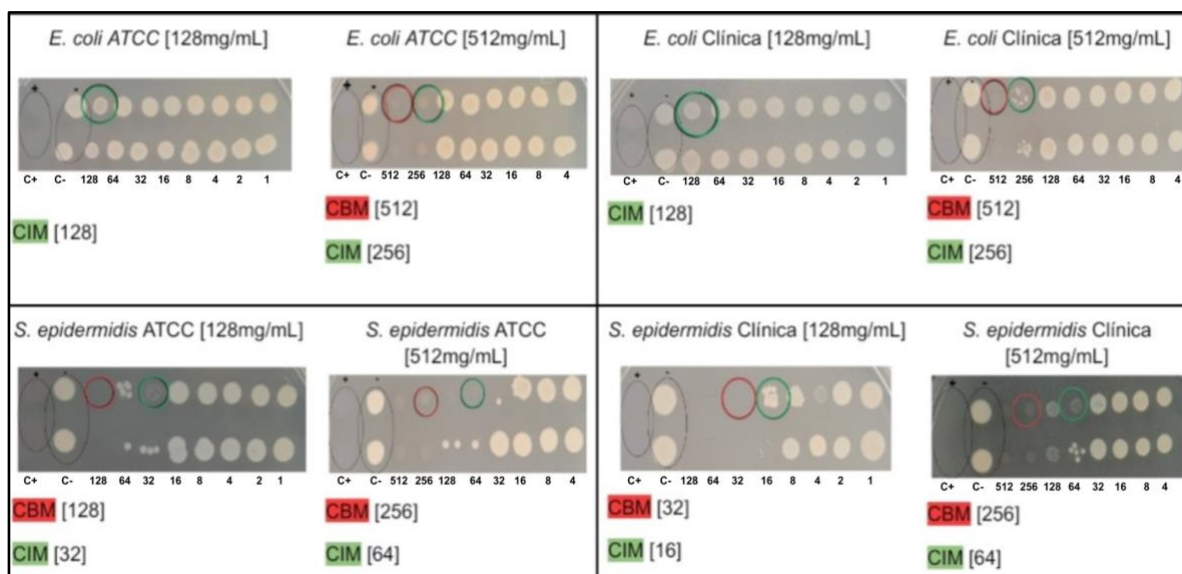
Amostras	Microrganismos	Solução [128mg/mL]		Solução [512mg/mL]	
		CBM	CIM	CBM	CIM
Cepa ATCC	<i>Escherichia coli</i> ATCC (12.241)	-	[128]	[512]	[256]
Amostra 7	<i>Escherichia coli</i>	-	[128]	[512]	[256]
Amostra 10	<i>Escherichia coli</i>	-	-	[512]	[256]
Cepa ATCC	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC (12.228)	[128]	[32]	[256]	[64]
Amostra 2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[128]	[32]	[256]	[64]
Amostra 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[32]	[16]	[64]	[16]
Amostra 12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[128]	[64]	[256]	[32]

Fonte: Os autores, 2023

Analisando a tabela 2, a solução com concentração de 128mg/mL apresentou atividade bactericida (CBM) sobre as cepas de *S. epidermidis* ATCC (12.228) e *S. epidermidis* 2, 3 e 12 nas concentrações [32] e [128], as quais foram possíveis observar a ação bactericida das soluções testadas, já as concentrações mais diluídas não mostraram eficácia contra as cepas. Na cepa de *E. coli* 10, a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e a CBM, na solução de 128mg/mL, não foram eficazes, em contrapartida, na solução de 512mg/mL, tanto a CIM quanto a CBM apresentaram efeito antibacteriano. Dessa forma, na solução de concentração 512mg/mL, o efeito bactericida e o efeito inibitório foram observados em todas as cepas e em diferentes concentrações.

Neste experimento, pode ser analisado um maior efeito antimicrobiano do cranberry para com as cepas de *S. epidermidis*, visto que, foram necessárias menores concentrações para as ações inibitórias e bactericidas e, em ambas soluções e cepas, foram exibidos as CBM e CIM.

Figura 1 - Figura ilustrativa da determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CIM (Concentração Inibitória Mínima) das diferentes concentrações nas cepas ATCC e clínicas isoladas - Técnica da Gota.



Legenda: A leitura foi realizada da direita para esquerda (menor para maior concentração)

Fonte: Os autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

As ITUs são condições médicas que afetam o aparelho geniturinário alto e baixo, sendo de maior prevalência no sexo feminino, em razão da anatomia do sistema urinário da mulher, em que a uretra é mais próxima ao ânus, facilitando a contaminação por bactérias presentes nesse sítio anatômico. Essas infecções são de rápida progressão e agravo, podendo chegar à sepse, se não forem tratadas de maneira eficiente (MORAES, *et al.*, 2021). O diagnóstico é feito a partir do exame de EAS (Elementos Anormais e Sedimentoscopia), analisando os parâmetros de nitrito, bacteriúria e leucocitúria e é confirmado pela urocultura, que indica o crescimento bacteriano e o perfil de sensibilidade antimicrobiana. Das 6 amostras positivas, 4 tiveram correlação com o exame EAS, sugerindo que a correlação das alterações desse exame com a urocultura positiva apresentou boa associação diagnóstica para a confirmação das ITUs.

Todavia, através dos resultados obtidos no estudo, pode-se analisar que o parâmetro de nitrito, executado a partir da fita reativa, não foi utilizado como referência decisiva, visto que existem bactérias que transformam nitrato em nitrito e, bactérias que não possuem esse tipo de metabolismo, desta maneira, esse fator não é diretamente relacionado com o diagnóstico de ITU, uma vez que a literatura expõe, a partir de um estudo realizado que, o nitrito mostra-se um indicador de baixa sensibilidade para cultura positiva. E, reiterando as amostras que obtiveram bactérias Gram-negativas com resultado negativo para nitrito, pode-se considerar que a bactéria necessite de um intervalo de mais de 4 horas, para realizar a redução do nitrato em nitrito e também nem todos os bacilos Gram-negativos possuem a enzima nitrato redutase, responsável por essa conversão, como dito anteriormente (MARQUES, *et al.*, 2017).

Os leucócitos, em relação a bacteriúria, em alguns casos, não apresentaram correlação em relação aos resultados da urocultura ou parâmetro de bacteriúria na urina. Como observado na amostra 10, onde percebe-se um desequilíbrio na leucocitúria (0/mL) com a bacteriúria (aumentada), sugerindo assim quadro de bacteriúria assintomática, com a presença de bactérias na urina sem sinais ou sintomas de infecção, o mesmo observado também na amostra de número 12.

Após a análise e correlação do exame EAS com a urocultura, foi testado o perfil de sensibilidade da solução do pó de cranberry (Cranberry CR - Herbarium), o qual se apresentou eficaz de maneira em que foi exibido ações inibitórias e bactericidas nas cepas clínicas. Estudos comprovam que o fruto possui um mecanismo de ação baseado no poder das proantocianidinas e a frutose de inibirem a aderência das fímbrias das bactérias uropatogênicas às células do tecido epitelial, inibindo o desenvolvimento e proliferação bacteriana (PINA, *et al.*, 2011).

A literatura permite ressaltar que a utilização do cranberry demonstra ser uma terapia eficaz em casos de ITU, além de servir como medida preventiva contra infecção recorrente. Isso é possível devido à ação das proantocianidinas e antocianinas, que representam os compostos ativos presentes na fruta. Esses compostos inibem a capacidade das fímbrias bacterianas de se fixarem na parede do trato urinário, impedindo, assim, a aderência das bactérias e a subsequente infecção. Além disso, sua capacidade anti-virulência, que enfraquece progressivamente a bactéria até sua completa inativação (CIMADON, *et al.*, 2021). Visto isso, um estudo de relato de caso demonstra resultados significativos do tratamento com cranberry, o qual uma mulher que apresentava sintomas clínicos de ITU, realizou exames de EAS e urocultura, os quais resultaram em leucocitúria e urocultura positiva para *E. coli* (> 1.000.000 UFC/mL), e, no antibiograma foi apresentado diversas resistências aos antibióticos. O tratamento oferecido foi com o extrato em pó do fruto de *Vaccinium macrocarpon* 2 vezes ao dia durante 20 dias. Após seis dias de tratamento com cranberry, a paciente relatou estar assintomática, com sedimento urinário normal e urocultura negativa (VENTURA, 2016).

É importante ressaltar que as bactérias se fixam no revestimento do trato urinário por meio de estruturas chamadas fímbrias, dessa forma, essa aderência é impedida pela presença de frutose encontrada no cranberry. No entanto, algumas cepas mais agressivas de bactérias, isoladas de amostras de pacientes com ITU recorrentes, exibem fímbrias diferentes, chamadas de p-fímbrias. Essas fímbrias estão associadas à ocorrência repetida de ITU e com a pielonefrite aguda, as quais podem ser inibidas pelas proantocianidinas (DAGOSTIN, 2016).

Os resultados obtidos no perfil de sensibilidade das cepas frente aos extratos de *Vaccinium macrocarpon* foram comprovados por meio do efeito bactericida das cepas clínicas, visto que, as condições de cepas clínicas são de características mais resistentes em comparação às cepas ATCC.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Os resultados mais satisfatórios do experimento se encaixam na solução de 512mg/mL nas cepas de *S. epidermidis*, sua CBM (Concentração Bactericida Mínima) aparece em todas as cepas e em menores concentrações em comparação as cepas de *E. coli*, indicando a ação bactericida do microrganismo estudado.

Conclusão

A partir das análises de amostras laboratoriais de rotina de urina, pode-se concluir que as alterações do exame EAS e a urocultura positiva, apresentaram boa relação diagnóstica para confirmação de ITU. Visto que, em sua maioria, há correlação entre seus aspectos físicos, químicos e microbiológicos. Desta forma, foi constatada a importância em se realizar exames de urina, de forma rotineira, principalmente em pessoas idosas, uma vez que se obteve metade das amostras positivas para bactérias de importância clínica. Pode-se concluir que houve a evidência da eficácia da solução do cranberry ao exercer um efeito inibitório/bactericida sobre as cepas isoladas, ressaltando seu potencial clínico como uma abordagem eficaz para amenizar os riscos associados às ITUs em pessoas da terceira idade.

Referências

BIZO, M. *et al.* Recorrência da internação por infecção do trato urinário em idosos. *Enfermagem em Foco*, v. 12, n. 4, 2021.

CIMADON, G. *et al.* Uso do *Vaccinium macrocarpon* (CRANBERRY) na profilaxia de infecções do trato urinário. *DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, v. 8, n. 3, p. 77–86, 22 out. 2021.

CORRÊA, E. F., MONTALVÃO, E. R. Infecção do trato urinário em geriatria. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 37, n. 4, 2010.

DAGOSTIN, S. F. F. Utilização de *Vaccinium macrocarpon* (CRANBERRY) para prevenção de infecção urinária recorrente: revisão da literatura e divulgação a profissionais de saúde. 2016.

LOPES, M., CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Infecções do trato urinário: uma revisão sobre as evidências científicas das principais plantas medicinais utilizadas na prática clínica. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 33, n. 1, p. 18-30, 2019.

MARQUES, A. G. *et al.* Desempenho da fita de urina como resultado presuntivo para cultura de urina negativa. *Einstein (São Paulo)*, v. 15, p. 34-39, 2017.

MASSON, L. C. *et al.* Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, [SL], v.52, n.1,p.77-81,2020.

MORAES, A. H. N. *et al.* Interface entre a urocultura, o EAS e o hemograma nas infecções do trato urinário. *Revista Brasileira Militar de Ciências*, v. 7, n. 19, 2021.

PINA, A. *et al.* Arando na profilaxia das infecções urinárias recorrentes: revisão baseada na evidência. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, Matosinhos, v.27, p.452457, 2011.

Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006.

SILVA, J. L. A. *et al.* Fatores associados à infecção de trato urinário em Instituição de Longa Permanência para idosos. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 74, 2020.

VENTURA, J. A. Infecção do trato urinário por *Escherichia coli* resistente a antibióticos tratados com *Vaccinium macrocarpon*: relato de caso. 2016.