

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Bruna Aparecida Lima Gonçalves

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO CLORIDRATO DE
PROCAÍNA ASSOCIADO OU NÃO AO BICARBONATO DE SÓDIO SOBRE
PATÓGENOS CAUSADORES DE INFECÇÃO URINÁRIA**

**BELO HORIZONTE - MG
2020**

Bruna Aparecida Lima Gonçalves

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO CLORIDRATO DE
PROCAÍNA ASSOCIADO OU NÃO AO BICARBONATO DE SÓDIO SOBRE
PATÓGENOS CAUSADORES DE INFECÇÃO URINÁRIA**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Dr. Armando de Mattos Carvalho

Coorientadora: Dra. Patricia M. Coletto Freitas

G635a Gonçalves, Bruna Aparecida Lima. 1983.
Agentes antimicrobianos, anestésicos locais, cistite, resistência microbiana medicamentos /
Bruna Aparecida Lima Gonçalves- 2020.

44p.: il.

Orientador: Armando de Mattos Carvalho
Coorientadora: Patrícia Maria Colleto Freitas

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Infecção – Urinária- Teses - 2 – Bactérias– Teses - I- Carvalho, Armando de Mattos
II – Freitas, Patricia Maria Colleto- III – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
V- Título.

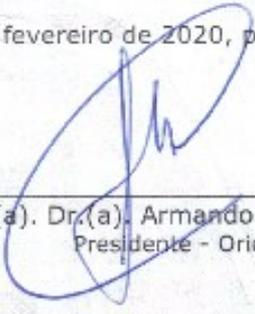
CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

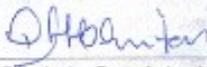
FOLHA DE APROVAÇÃO**BRUNA APARECIDA LIMA GONÇALVES**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

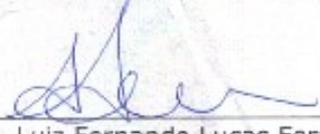
Aprovado(a) em 06 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



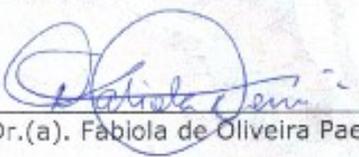
Prof(a). Dr.(a). Armando de Mattos Carvalho
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Patricia Maria Coletto Freitas



Prof(a). Dr.(a). Luiz Fernando Lucas Ferreira



Prof(a). Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me encaminhado para o mestrado.

A minha família pelo apoio e investimento nos meus estudos.

Ao meu marido, Leandro, por entender e acolher esse momento tão importante na minha vida.

Ao meu mentor Leonardo Vianna pela confiança e ensinamentos.

A Cibele Siqueira pela ajuda na realização do projeto.

Ao meu orientador Armando e minha coorientadora Patrícia pelo apoio e confiança.

A Camila de Castro e tia Zezé pela ajuda nesse sonho.

Sem vocês nada disso seria possível.

Resumo

A infecção do trato urinário é uma enfermidade comumente diagnosticada em animais de companhia, sendo responsável por um amplo número de prescrições de antimicrobianos. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* são os microrganismos mais envolvidos nas infecções do trato urinário em cães. O surgimento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos está crescendo nas últimas décadas, sendo um problema alarmante no cenário mundial. Alternativas de tratamento com novas substâncias já é uma realidade. Os anestésicos locais têm também a função de serem antimicrobianos. Objetivou-se com este estudo avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* do cloridrato de procaína 0,7% associado ou não ao bicarbonato de sódio sobre patógenos causadores de infecção urinária de cães e gatos. Para tal, cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933 foram utilizadas. As soluções de cloridrato de procaína a 0,7%; bicarbonato de sódio a 0,023%; solução contendo cloridrato de procaína 0,7% com bicarbonato de sódio a 0,023% foram testadas por meio dos métodos de diluição em caldo e disco-difusão (antibiograma) para verificar suas ações antimicrobianas. Os testes foram realizados em triplicatas e com controles positivo e negativo. O *Staphylococcus aureus* mostrou ausência de crescimento no teste diluição em caldo nas soluções de cloridrato de procaína, cloridrato de procaína associado ao bicarbonato de sódio e bicarbonato de sódio, já com *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* houve crescimento bacteriano. No antibiograma houve formação de halo com as três bactérias, *Staphylococcus aureus* com as três soluções (cloridrato de procaína 0,7%, cloridrato de procaína associado a bicarbonato de sódio e bicarbonato de sódio), já com *Proteus mirabilis* houve formação de halo com as duas soluções (cloridrato de procaína 0,7% e a associação do cloridrato de procaína com bicarbonato de sódio) e com *Escherichia coli* teve formação de halo somente com a solução de cloridrato de procaína a 0,7%. Assim, o cloridrato de procaína a 0,7% demonstrou possuir ação antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* e o bicarbonato de sódio sozinho teve ação antimicrobiana somente com *Staphylococcus aureus*. A associação do cloridrato de procaína e o bicarbonato de sódio teve ação somente com *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, não apresentando efeito em relação a *Escherichia coli*.

Palavras chaves: agentes antimicrobianos, anestésicos locais, resistência microbiana a medicamentos.

Abstract

Urinary tract infection is a commonly diagnosed disease in companion animals, being responsible for a wide number of antimicrobial prescriptions. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus* are microorganisms involved the most in urinary tract infections in dogs. The rise of multi-resistant bacteria to antimicrobials is growing in recent decades, being an alarming problem in the world scenario. Alternative treatment with new substances is already a reality. Local anesthetics have also the function of being antimicrobial. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action in vitro of 0.7% procaine hydrochloride associated or not with sodium bicarbonate on pathogens that cause urinary tract infections in dogs and cats. For this, standard strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Proteus mirabilis* ATCC 25933 were used. A solution of 0.7% procaine hydrochloride, 0.023% sodium bicarbonate, and 0.7% procaine hydrochloride mixed with 0.023% sodium bicarbonate, were tested using broth dilution and disk-diffusion (antibiogram) methods to verify their antimicrobial actions. The tests were performed in triplicates with positive and negative controls. *Staphylococcus aureus* showed no growth in the broth dilution test with 0,7 % procaine hydrochloride, procaine hydrochloride associated with sodium bicarbonate and sodium bicarbonate, while *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* had bacterial growth. In antibiogram, halos were formed with all three bacteria, *Staphylococcus aureus* formed a halo with all solutions (0.7% procaine hydrochloride, procaine hydrochloride associated with sodium bicarbonate and sodium bicarbonate), *Proteus mirabilis* formed a halo in two solutions (0.7% procaine hydrochloride and the association of procaine hydrochloride with sodium bicarbonate) and *Escherichia coli* formed a halo only with 0.7% procaine hydrochloride solution. Accordingly to this study, 0.7% procaine hydrochloride solution has demonstrated having antimicrobial action against all three strains of bacteria *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*, whilst sodium bicarbonate alone had antimicrobial action with *Staphylococcus aureus*. The association of procaine hydrochloride and sodium bicarbonate had action only with *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*, having no effect on *Escherichia coli*.

Keywords: antimicrobial agents, local anesthetics, microbial drug resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem fotográfica da placa de Petri contendo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 replicado em ágar sangue -----	25
Figura 2. Imagem fotográfica da placa de Petri contendo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 replicada em ágar sangue -----	25
Figura 3. Desenho esquemático do teste em caldo -----	27
Figura 4. Desenho esquemático da placa de petri com os discos testados -----	28
Figura 5. Imagem fotográfica da placa de Agar Mueller- Hinton inoculada com <i>Staphylococcus aureus</i> , utilizando disco de cloridrato de procaína a 0,7% para teste de disco-difusão (antibiograma) -----	31
Figura 6. Imagem fotográfica do tubo de ensaio com caldo Mueller – Hinton, <i>Proteus mirabilis</i> e solução de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023% para teste de diluição em caldo -----	34
Figura 7. Imagem fotográfica da placa de Agar Mueller - Hinton inoculada com <i>Escherichia coli</i> , utilizando disco de cloridrato de procaína a 0,7% para teste de disco-difusão (antibiograma) -----	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* no teste de diluição em caldo com uso de cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023%, solução de cloridrato de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023% -----29

Tabela 2. Formação de halo de *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* no teste de disco-difusão (antibiograma) com uso de cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023% e solução de cloridrato de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023% -----30

LISTA DE SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC *American Type Culture Collection*

CLSI *Clinical and Laboratory standards Institute*

DEAE Dietilaminaetanol

E. coli *Escherichia coli*

EDTA – Tris ácido etileno diamino tetra acético - hidroximetil-aminometano

ISO *International Organization for Standardization*

ITU Infecção do Trato Urinário

LD50 Dose letal mediana

PABA Ácido Para Animobenzoico

S. Aureus *Staphylococcus aureus*

SARM *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

UFC Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Infecção do trato urinário em cães e gatos	12
2.2 Resistência antimicrobiana.....	16
2.3 Anestésicos locais como antimicrobianos.....	19
2.4 Métodos complementares e outros agentes antimicrobianos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÕES.....	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Na clínica de animais de companhia é alta a frequência de animais com infecção do trato urinário (ITU), a qual se caracteriza pela presença de microrganismos na urina. Os patógenos mais comuns são as bactérias. As infecções podem se manifestar de várias maneiras ou serem assintomáticas (Fongaro, 2011). Estudos revelaram que 95% das ITU em cães com doenças adjacentes tem manifestação subclínica (Menano Maia, 2016).

A caracterização de uma infecção do trato urinário deve ser baseada em avaliação clínica e laboratorial. Os testes laboratoriais mais utilizados envolvem a urinálise e a urocultura. A urocultura permite identificar o microrganismo causador e indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no trato urinário. Tem também o antibiograma que permite a análise da efetividade dos antimicrobianos (Fongaro, 2011; Weese *et al.*, 2019).

Os agentes frequentemente isolados nas culturas de cães com ITU são a *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Pasteurella* spp, *Pseudomonas* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Bacillus* sp, *Corynebacterium* spp, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp, *Hafnia alvei* (Reche Junior, 2005; Carvalho *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014). Segundo Furini *et al.* (2013), os principais agentes isolados de urina de cães são *Escherichia coli* (37,64%), *Staphylococcus* sp (19,66%) e *Proteus* spp (13,48%). Também é possível isolar micoplasmas, mas a sua importância clínica não está elucidada (Menano Maia, 2016).

As ITUs estão entre as infecções mais comuns que requerem o uso de antimicrobianos. A terapia com antimicrobiano deve ser escolhida com base nos resultados do antibiograma. Porém, a maioria dos animais com infecção urinária necessita de tratamento antes da obtenção dos resultados definitivos dos testes de cultura e antibiograma (Braibante, 2013; Ferreira *et al.*, 2014).

Para o tratamento é necessário fazer um diagnóstico e prescrição adequadas, além de conscientizar os veterinários do uso criterioso de antimicrobianos para evitar seleção de microrganismos resistentes (Ban Al-Sayyed *et al.*, 2019). Segundo Penna *et al.* (2010), Furini *et al.* (2013) e Weese *et al.* (2015), o tratamento empírico contribui para o aumento da resistência bacteriana, infecções de repetição e complicações associadas ao uso indiscriminado dos antimicrobianos.

Com o aumento da multirresistência bacteriana, levando a um maior aumento na taxa de mortalidade dos pacientes hospitalizados (Póvoa, 2016), há necessidades de desenvolvimento de fármacos com efeitos antimicrobianos e medidas complementares para conter a propagação de microrganismos resistentes (Scherer *et al.*, 2017).

Nesse contexto, fármacos como os anestésicos locais, com ação antimicrobiana (Adler *et al.*, 2017), podem ser iniciados com o intuito de auxiliar ou até mesmo tratar a infecção urinária, antes da obtenção dos resultados da urocultura e do antibiograma, ou como fármacos adjuvantes no tratamento contra bactérias resistentes. Lazdunski *et al.* (1979) verificaram que a procaína a 0,55% tem efeito inibitório sobre o crescimento celular da *Escherichia coli*. Johnson *et al.* (2008) verificaram que a bupivacaína (0,125%-0,75%) e lidocaína (1%) tem ação bacteriostática e bactericida, por meio da indução de efeitos em células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, além de efeito fungistática e fungicida.

Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* do cloridrato de procaína associado ou não ao bicarbonato de sódio sobre patógenos causadores de infecção urinária de cães e gatos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do trato urinário em cães e gatos

A infecção do trato urinário (ITU) se caracteriza pela presença de microrganismos na urina, e pode se manifestar de várias maneiras ou ser assintomática (Fongaro, 2011; Menano Maia, 2016).

A ITU está relacionada à colonização microbiana do epitélio estratificado dos variados “nichos do trato urinário” como mucosa uretral, bexiga, ureteres, pelve renal, túbulos contorcidos e ductos coletores dos rins. A multiplicação bacteriana em locais do trato urogenital deve-se principalmente à ascensão de bactérias presentes na porção distal da uretra, muitas vezes originárias da microbiota intestinal. A criação de um ambiente favorável para tal fenômeno se dá por meio das alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e à presença de fatores de virulência bacterianos que as tornam mais aptas para causarem a infecção (Bartges, 2004; Carvalho *et al.*, 2014).

A inflamação crônica leva a uma disfunção urotelial e alteração da proliferação celular basal, a regeneração urotelial inadequada leva a persistência da cistite bacteriana, todo esse

processo leva a integridade prejudicada do revestimento das células uroteliais e consequente aumento da permeabilidade da parede da bexiga e todo o trato urinário (Qian- Sheng *et al.*, 2019).

A caracterização de uma infecção do trato urinário deve ser baseada em avaliação clínica e laboratorial. Os testes laboratoriais mais utilizados envolvem a urinálise e a urocultura. A urocultura permite identificar o microrganismo causador, indica a presença bacteriana no trato urinário. Já o antibiograma permite a análise da efetividade dos antimicrobianos (Fongaro, 2011; Weese *et al.*, 2019).

A terapia antimicrobiana deve ser escolhida com base nos resultados do antibiograma. Assim, é importante que se defina o agente etiológico com o diagnóstico laboratorial para a realização de uma conduta terapêutica eficaz (Furini *et al.*, 2013; Weese *et al.*, 2019), direcionando a terapia antimicrobiana ao patógeno conhecido (Weese *et al.*, 2015). Ou seja, a identificação dos agentes causadores, junto com seus dados epidemiológicos e sua susceptibilidade aos antimicrobianos otimizam o tratamento, e evitam falhas terapêuticas devido ao uso incorreto e a resistência bacteriana (Remonato, 2006).

Segundo Carvalho *et al.* (2014), em 75% dos casos as infecções têm como etiologia agentes Gram-negativos, sendo a *Escherichia Coli* (*E. coli*) o principal agente etiológico dessa infecção nos animais e no homem. Furini *et al.* (2013) após isolarem microrganismos da urina de 178 animais com ITU, observaram prevalência de *E. coli* (37,64%), *Staphylococcus sp* (19,66%) e *Proteus spp* (13,48%). Segundo Braibante (2013) e Marques *et al.* (2019), a *Escherichia coli*. e o *Proteus mirabilis* são os maiores causadores de ITU, sendo que as reinfecções por bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* surgem decorrentes de um comprometimento do sistema imunológico do paciente.

A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, mais comum na microbiota intestinal fecal. Segundo Trabulsi e Alterthum (2015) e Póvoa (2016), a *E. coli* uropatogênica é a maior responsável pelas infecções do trato urinário. Também, de acordo com Lacerda (2013), a *E. coli* uropatogênica é a principal causadora das infecções do trato urinário recorrentes e persistentes em humanos, principalmente em cistites, prostatites e pielonefrites. Uma das causas dessa resistência é o desenvolvimento de “comunidades” bacterianas intracelulares. As células bacterianas aderem às células do epitélio de transição tipicamente encontrado na bexiga, em seguida ocorre

invasão celular, com posterior multiplicação intracelular e formação dessas comunidades bacterianas, favorecendo a disseminação bacteriana e infecção de novas células epiteliais.

Proteus spp é uma bactéria membro da família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativo, sendo isolada mais comumente em infecção do trato urinário persistentes, em pacientes com anormalidades funcionais ou anatômicas. *Proteus mirabilis* tem sido mais frequentemente associado com ITU em jovens (Póvoa, 2016). Segundo Trabulsi e Alterthum (2015) é a espécie mais importante em relação a infecções urinárias adquiridas.

Staphylococcus spp são cocos Gram-positivos. É uma das espécies bacterianas mais estudadas, pois apresenta um impacto na saúde pública, por ser comensal na mucosa e na pele (Penna *et al.*, 2010). Segundo Trabulsi e Alterthum (2015) é resistente a praticamente todo quimioterápico concebido pela humanidade.

De acordo com Shrestha *et al.* (2019), as bactérias Gram-positivas são uma causa significativa de ITU, sendo o *Staphylococcus aureus* e o *Enterococcus faecalis* os patógenos mais isolados. Nas ITUs adquiridas por cateter, neste estudo, o *Staphylococcus aureus* foi o patógeno mais comum. Além disso, este estudo também demonstrou que o uso prolongado de cateteres vesicais aumenta o risco de ocorrência de ITU em até 14 vezes.

De acordo com Bartges (2004) e Thornton *et al.* (2018), alguns mecanismos de defesa protegem o organismo contra a invasão de patógenos, e propriedades da urina fazem parte dessa defesa. Em um estudo *in vitro* e em crianças observou-se que a osmolaridade da urina influenciou no crescimento de *E. coli* na urina. Esse microrganismo teve maior multiplicação em urina ácida a neutra e diluída, quando comparada a urina alcalina e concentrada. Segundo Thornton *et al.* (2018), também as concentrações extracelulares de sódio, influenciando o pH, podem inibir o crescimento de *E. coli*, que é sensível a presença de íon sódio em altas concentrações.

Contudo, a ITU está entre as infecções mais comuns que requerem o uso de antimicrobianos. A terapia com antimicrobiano deve ser escolhida com base nos resultados do antibiograma (Braibante, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). Na década de 30 teve a descoberta das sulfonamidas e das penicilinas. Porém nas décadas de 50 e 70 já foram descobertas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina (Silva *et al.*, 2017), havendo dessa forma um rápido desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana no gênero *Staphylococcus*, tanto no homem quanto nos cães (Penna, *et al.*, 2010).

Na atualidade, vários são os antimicrobianos utilizados para o tratamento das infecções urinárias, como os beta-lactâmicos, sulfametazol - trimetoprim, fluorquinolonas e aminoglicosídeos (Remonato, 2006). Segundo Carvalho *et al.* (2014), a sulfametazol - trimetoprim, amoxicilina, cefalexina e tetraciclina são os fármacos de primeira escolha para os quadros de cistite bacteriana, entretanto de acordo com esses autores, esses antimicrobianos não mostraram efetividade *in vitro* para um número elevado de patógenos. Para Furini *et al.* (2013), as fluorquinolonas são os fármacos mais utilizados, em cães, por seu amplo espectro, mas a resistência de microrganismos tem aumentado nos últimos anos. Segundo Thompson *et al.* (2011) a resistência bacteriana não está crescendo somente com as fluorquinolonas, mas também com as cefalosporinas de terceira geração e amoxicilina com clavulanato.

Segundo Ollin e Bartges (2015), amoxicilina e sulfametazol - trimetoprim são a primeira opção para tratamento de ITU não complicada e para a complicada, antes do resultado da urocultura e do antibiograma. Entretanto, a amoxicilina é ineficaz para bactéria produtora de B-lactamase. De acordo com Wesse *et al.* (2019), a amoxicilina é uma boa opção para cistite bacteriana esporádica.

Em um estudo realizado com isolados de *E. coli* decorrentes de ITU de cães e gatos, observou-se diferença entre as espécies quanto a sensibilidade e conseqüentemente tratamento com amoxicilina e amoxicilina com clavulanato. Os isolados de *E. coli* dos cães mostraram alta susceptibilidade a amoxicilina com clavulanato, já nos gatos nenhum isolado mostrou ser susceptível a esse antibiótico. O estudo concluiu que há diferença na escolha do fármaco de tratamento entre animais de companhia com a mesma doença e o mesmo patógeno (Kukanich *et al.*, 2019).

Smith *et al.* (2018) recomendaram a amoxicilina, amoxicilina com clavulanato e cefalexina como primeira escolha para o tratamento de ITU em cães e gatos. Entretanto, em estudos retrospectivos de mais de 11.000 pacientes de quatro continentes sugeriram que a cefazolina apresenta a mesma eficácia, sendo menos nefrotóxica quando comparada às penicilinas (flucloxacilina, nafcilina e cloxacilina) em pacientes com bacteremia decorrente de *Staphylococcus aureus* (Weis *et al.*, 2019).

De acordo com Weese, *et al.* (2019), as quinolonas são amplamente utilizadas para tratar infecção urinária em animais. Entre elas a ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacino e orbifloxacino. A ciprofloxacina possui menor biodisponibilidade quando

administrada oralmente que enrofloxacina, sendo ambas recomendadas quando há resistência de patógenos a outros antimicrobianos, pois são excretadas na urina na forma ativa. A doxiciclina também pode ser utilizada quando há resistência.

Menano Maia (2016) descreveu que é essencial que o animal esteja com os adequados mecanismos de defesa, pois assim a terapia antimicrobiana será mais eficaz, já que nos pacientes imunossuprimidos observa-se uma menor resposta aos antimicrobianos.

De acordo com Zalewska- Piatek e Piatek (2019), é necessário desenvolver métodos complementares e estratégias terapêuticas para combater as ITUs, como vacinas, análogos de receptores, compostos que interferem na aderência bacteriana e terapia bacteriofágica. Esses tratamentos permitem aumentar a imunidade do hospedeiro para combater patógenos externos, e diminuir a aderência bacteriana à parede da bexiga. Vacinas mortas e atenuadas de *E. coli* e *Proteus mirabilis* estão sendo desenvolvidas com o objetivo de o hospedeiro produzir anticorpos contra esses patógenos. Essas novas abordagens também são responsáveis pela neutralização de patógenos e pela proteção do hospedeiro contra a doença.

2.2 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é definida como resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos (Shrestha *et al.*, 2019). Ela vem sendo um problema emergente em animais de companhia e em humanos (Wong *et al.*, 2015). O tratamento empírico contribui para o aumento da resistência, infecções de repetição e complicações associadas ao uso indiscriminado dos antimicrobianos (Penna *et al.*, 2010; Furini *et al.*, 2013; Weese *et al.*, 2015). Assim, as linhagens multirresistentes em cães e gatos podem aumentar com o uso indiscriminado e indevido de antimicrobianos, seja por subdoses, superdoses, descontinuidade do tratamento e uso como promotores de crescimento (Siqueira *et al.*, 2008). Além disso, a terapia antimicrobiana de amplo espectro a longo prazo, comorbidades, hospitalizações anteriores e transmissão cruzada de patógenos em pacientes cateterizados podem explicar o aumento da resistência bacteriana (Shrestha *et al.*, 2019).

De acordo com Menano Maia (2016), algumas bactérias têm apresentado perfis multirresistentes (resistentes a três ou mais classes diferentes de agentes antimicrobianos) devido aos seus mecanismos de trocas de material genético.

Weese *et al.* (2015) relataram que as infecções por patógenos resistentes a antimicrobianos estão geralmente associadas ao aumento da morbidade e mortalidade, e

aumento dos custos dos tratamentos. Segundo este autor, mesmo se for constatado a presença do patógeno multirresistente na urina não significa a necessidade de uso de um antimicrobiano de amplo espectro, podendo ser utilizado um fármaco de menor espectro, porém comprovadamente eficaz no teste de antibiograma.

Segundo Lacerda (2013), cerca de 80% das infecções bacterianas humanas estão relacionadas à formação de biofilme, e os microrganismos comumente encontrados são os *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* uropatogênica. De acordo com Bahr Arias *et al.* (2008), os microrganismos Gram-negativos são a maioria encontrada nas infecções por agentes multirresistentes.

Em um levantamento do período de fevereiro de 2017 a junho de 2019 de cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, que apresentavam infecção do trato urinário decorrente de diversas causas, causada por uma ou mais bactérias multirresistentes, verificou-se presença de *Proteus mirabilis* (41,6%), *Escherichia coli* (25%), *Klebsiella* sp (16,6), *Acinetobacter* sp (8,3%), *Enterococcus faecium* (8,3%), *Leclercia adecarboxylata* (8,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,3%), *Citrobacter* sp (8,3%), *Enterococcus* sp (8,3%), *Staphylococcus saprophyticus* (8,3%) e *Staphylococcus haemolyticus* (8,3%). Também encontrou resistência bacteriana com relação a 33 bases de antimicrobianos, entre elas a amicacina, ceftriaxona, ceftiofur sódico, meropenem e vancomicina. Os antimicrobianos que as bactérias apresentaram maior resistência foram a doxiciclina (88%), ceftriaxona (83%), sulfametazol - trimetropim (78%), amoxicilina com clavulanato (75%), cefalexina (67%), enrofloxacina (60%), nitrofurantoína (46%) e amicacina (33%). O agente *Proteus mirabilis* apresentou resistência a 18 bases de antimicrobianos, seguido pelo patógeno *Klebsiella* sp (15 bases) e *Citrobacter* (10 bases). Contudo os autores concluíram que o uropatógeno *Proteus mirabilis* foi o microrganismo multirresistente mais frequente nas infecções do trato urinário, sendo também o que apresentou maior resistência aos antimicrobianos testados (Gonçalves e Freitas, 2019).

Em seu estudo, Siqueira *et al.* (2008) isolaram 24 linhagens (47,1%) de *E. coli* da urina de cães com ITU, e observaram resistência a pelo menos três antimicrobianos. De acordo com esses autores, determinadas linhagens de *E. coli* apresentam resistência aos antimicrobianos por possuírem em seu DNA fator de resistência, ou por seleção genética, mutações e produção de enzimas. Em outro estudo de Thompson *et al.* (2011) durante um período de nove anos com cães com ITU mostraram que a resistência a *E. coli* para as

fluorquinolonas está crescendo. Sabe-se do risco zoonótico e implicações em saúde pública desses microrganismos resistentes a antimicrobianos.

Segundo Remonato (2006) um estudo realizado no período de 1998 e 1999 em seis centros brasileiros foi encontrado 47,8% de *E. coli* urinárias resistentes a sulfametazol - trimetoprim, 11,5% à cefalotina e 6,4% a ciprofloxacino. Também verificou-se resistência de *E. coli* isoladas de ITU de humanos para ampicilina (59%), cefalotina (42%), ciprofloxacino (22%), gentamicina (6%) e sulfametazol - trimetoprim (50%). Neto *et al.* (2003) observaram em 188 pacientes humanos com ITU que a *E. coli* isolada de urina era mais susceptível a imipenem, segunda e terceira gerações de cefalosporinas, aminoglicosídeos, ciprofloxacino e nitrofurantoína, sendo resistente a ampicilina, sulfametazol - trimetoprim e norfloxacino.

Majeed *et al.* (2019) também observaram em 120 pacientes humanos bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *Proteus mirabilis* susceptíveis ao imipenem, apresentaram resistência ao amoxicilina e cefalosporinas de terceira geração.

Marques *et al.* (2019) em um estudo no qual foram isoladas bactérias de 107 animais de companhia com ITU, observaram resistência para *Proteus mirabilis* em 22 bases antimicrobianas de 26 testadas, entre elas a sulfametazol - trimetoprim (35,5%), ampicilina e cloranfenicol (28%), enrofloxacina (26,2%), amoxicilina com clavulanato (9,4%), cefalotina, (8,4%), ciprofloxacino (7,5%), levofloxacina (6,5%), gentamicina (5,6%), norfloxacino e amicacina (2,8%). Segundo Kwiecińska-piróg *et al.* (2019), o *Proteus mirabilis* é a terceira espécie comum responsável pelas ITUs, sendo tratadas principalmente com fluorquinolonas ou aminoglicosídeos. Esses autores observaram em um estudo que vários antimicrobianos que eram capazes de inibir o crescimento de diversas bactérias, foram incapazes de inibir a formação de biofilme do *Proteus mirabilis*, mostrando assim seu alto poder de resistência a antimicrobianos.

O *Staphylococcus aureus* está entre os microrganismos que apresentam maior resistência aos antimicrobianos, podendo desenvolver resistência às meticilinas (SARM). Em um estudo das seis regiões mundiais realizado pela Organização Mundial de Saúde, observou-se resistência a meticilina em 80% das cepas na região Africana e do Pacífico Ocidental, 90% na região Americana, 50% na região do Mediterrâneo Oriental, 60% na região Europeia e 25% na região Sudeste da Ásia (Araujo e Longo, 2016). Membros desse gênero têm alta frequência de conjugação e frequentemente adquirem plasmídeos que codificam a resistência microbiana (Penna *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado com 70 cães que apresentavam *Staphylococcus sp* no exame de urocultura, a resistência foi detectada para ampicilina em 72,9%, para amoxicilina em 71,5%, para sulfametazol - trimetoprim em 67,2% e para oxacilina em 25,7%. Com esse estudo foi concluído a alarmante resistência ao gênero *Staphylococcus* isolados de ITU canina, e os autores enfatizaram a importância de identificação das espécies e realização de teste de susceptibilidade bacteriana para o correto tratamento do paciente (Penna *et al.*, 2010). Assim, de acordo com Smith *et al.* (2018), uma das classes de antimicrobianos que devem ser utilizados quando há resistência bacteriana são os carbapenêmicos, pois possuem amplo espectro, atuando em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicos e anaeróbicos.

Em um estudo retrospectivo realizado em um hospital veterinário, foi observado que 3% das infecções por *E. coli* e *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência aos carbapenêmicos (Smith *et al.*, 2018). Além dos carbapenêmicos, segundo Navaneeth *et al.* (2019), a vancomicina é um antibiótico que pode ser usado nos casos de infecção por SARM, além da clindamicina, as tetraciclina, sulfametazol - trimetoprim, as oxazolidinonas, daptomicina, ceftarolina fosamida.

Segundo Shrestha, *et al.* (2019), a fosfomicina, o imipenem, meropenem e a nitrofurantoína são indicadas quando há multirresistência. A fosfomicina foi utilizada com sucesso em um estudo para tratamento de pacientes com ITU complicada causada por enterobactérias produtoras beta-lactamase (Bielen e Likic, 2019). De acordo com estudo de Xu e He (2019), os carbapenêmicos e a fosfomicina foram efetivos para o tratamento das ITUs causadas por *E. coli* produtora de beta-lactamase, sendo que a fosfomicina teve um resultado efetivo mais rápido em menos dias.

2.3 Anestésicos locais como antimicrobianos

As primeiras observações que os anestésicos locais inibiam o crescimento bacteriano foram realizadas em 1909. Nas décadas de 60 e 70 novos estudos foram conduzidos *in vitro* com a lidocaína e procaína em bactérias e leveduras (Pelz *et al.*, 2008; Kaewjiranai *et al.*, 2018). Em 1990 e 1994 foram demonstradas as atividades bacteriostática e bactericida da lidocaína e bupivacaína (Johnson *et al.*, 2008).

Segundo estudo realizado por Pelz *et al.* (2008), os anestésicos locais bupivacaína, mepivacaína, prilocaína, lidocaína e procaína apresentaram ação antimicrobiana contra componentes da flora oral, entre eles o *S. aureus*. Lazdunski *et al.* (1979) verificaram que a

procaína a 0,55% tem efeito na inibição do processamento de precursores de proteínas da membrana externa da *E. coli*.

Johnson *et al.* (2008) verificaram que a bupivacaína (0,125%-0,75%) e a lidocaína (1%) tem ação bacteriostática, bactericida, fungistática e fungicida, por meio da indução de efeitos em células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, como aumento na desordem lipídica da membrana, com conseqüente aumento da fluidez e permeabilidade, induzindo assim alterações ultra estruturais. Além disso, segundo Kaewjiranai *et al.* (2018) e Kan *et al.* (2018), a ação antimicrobiana dos anestésicos locais ocorre por meio da inibição da atividade da membrana respiratória, o escape de íons K^+ do interior do citoplasma bacteriano (devido à alteração de permeabilidade), e a interferência na síntese de DNA e RNA.

Adler *et al.* (2017) demonstraram a ação antimicrobiana dos anestésicos locais *in vitro* contra as bactérias *Actinobacillus*, *Corybacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Concentrações clinicamente aplicadas de bupivacaína, lidocaína e mepivacaína inibiram o crescimento visual de 93%, 93% e 80% desses isolados testados, respectivamente. Quatro desses isolados eram de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, e cinco *E. coli* produtoras de beta-lactamase. Esses isolados eram resistentes a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, lincosamidas, macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclina. Segundo os autores, dessas soluções testadas, a de lidocaína tinha o conservante metil parahidroxibenzoato, que pode ser responsável por alguma parte da atividade antimicrobiana. Nesse estudo observou que as espécies menos susceptíveis foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Esses isolados foram extraídos de equinos da microbiota de mucosa, cutânea e intestinal. O teste utilizado foi de microdiluição em caldo Mueller – Hinton. Uma limitação do estudo foi que o teste de microdiluição em caldo não necessariamente mimetiza a exposição *in vivo* da bactéria aos anestésicos locais.

Leung e Rawal (1977) verificaram em seu estudo a ação antimicrobiana da tetracaína. De acordo com esses autores, a tetracaína atuou na membrana plasmática de *Pseudomonas aeruginosa*, onde promoveu extravasamento de compostos intracelulares e lise celular. Nesse estudo também os autores observaram que a *Pseudomonas aeruginosa* era resistente a lidocaína e procaína. A tetracaína tópica também inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Staphylococcus albus* e *Pseudomonas aeruginosa*, segundo o estudo realizado por Kleinfeld e Ellis (1967).

De acordo com Labedan (1988), a presença de anestésico local parece facilitar a entrada e ação dos antibióticos hidrofóbico e hidrofílico. Antibióticos usualmente ineficazes contra células intactas de *E. coli* de tipo selvagem foram mais eficientes contra células tratadas conjuntamente com anestésicos locais, houve melhor penetração do antibiótico. Segundo esse autor, o uso de baixas doses de anestésico local com antibióticos pode ser clinicamente vantajoso, especialmente quando é necessário ampliar e diversificar a gama de antimicrobianos.

A procaína é um anestésico local que pertence ao grupo éster, o primeiro anestésico local sintético injetável. Foi descoberta em 1905 por Alfred Einhorn, um bioquímico austríaco. Ela é hidrolisada em ácido para animobenzóico (PABA) e dietilaminoetanol (DEAE), sendo rapidamente absorvida após a administração intramuscular, intradérmica e subcutânea. A procaína é rapidamente hidrolisada, não se acumula nos tecidos e plasma, se liga pouco a proteínas. É metabolizada no plasma pelas pseudocolinesterases. O PABA aparece 80, 90% conjugado na urina, a DEAE também aparece na urina 33,3% inalterada, o restante é degradado em outros metabólitos. O tempo médio de degradação é de sete a vinte minutos (Bulcão *et al.*, 2011).

A procaína a 1% induz uma tensão bioelétrica na membrana celular de cerca de 290 milivolts, tendo a capacidade de repolarizar e estabilizar o potencial de membrana das células afetadas, permitindo assim recuperar-se e estabilizar o sistema neurovegetativo (Burrel, 2008). Ela ingressa no citosol e modifica as interações elétricas entre citosol e os microtúbulos de maneira que altera a propagação de sinais. Atua sobre campos eletromagnéticos reestabelecendo e reordenando os cristais líquidos do organismo. Passa através das membranas danificadas, aumenta o consumo de oxigênio o que ajuda na reparação da membrana celular (Fischer, 2000; Castro, 2011).

A escolha da dose para utilização em animais leva em consideração a toxicidade do fármaco, que em cães que é de aproximadamente 15 mg/kg, sendo que a LD50 do cloridrato de procaína em cães é de 250 mg/kg quando injetado de forma intradérmica. Em um estudo realizado em cães com dermatite atópica, utilizou-se cloridrato de procaína a 0,7% conforme é utilizada na Terapia Neural. Neste trabalho foi realizada nos animais aplicação venosa na dose de 0,1 mg/Kg associada a aplicação intradérmicas, (10 a 25) pápulas não excedendo a dose de 7,0mg/kg por sessão, com bons resultados no controle da atopia (Bravo-Monsalvo, 2008).

As bases teóricas da Terapia Neural fazem parte da fisiologia russa de meados do século XIX. Posteriormente, na primeira metade do século XX os irmãos alemães Huneke aprofundaram na pesquisa e prática da Terapia Neural. Praticamente teve início com a descoberta do primeiro anestésico sintético, a procaína. Consiste na utilização de anestésicos locais (lidocaína e procaína) com baixas concentrações em partes do corpo escolhidas, conforme o distúrbio (Castro, 2011).

[Com o desenvolvimento e dispersão da Terapia Neural nos últimos 30 anos a procaína tem sido utilizada para o tratamento de doenças agudas e crônicas, possui ação anti-inflamatória sendo benéfica também em doenças inflamatórias (Bulcão *et al*, 2011).

O bicarbonato de sódio a 1,1% tem efeito antibacteriano e efeito tampão no pH salivar (Soncco & Mamani, 2018), possuindo ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *in vitro*, como o *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (Pinto *et al.*, 2013). O bicarbonato de sódio altera o pH do meio, ele aumenta o pH extracelular e diminui o pH intracelular (Levrant *et al.*, 1996; Shoichiro Ibusuki *et al.*, 1998). Segundo Dokai *et al.* (2018) os patógenos agem de forma diferente a presença de minerais, como o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Dokai *et al.* (2018) a adição de bicarbonato de sódio alcaliniza o pH externo, essa mudança de pH no meio provoca um estresse bacteriano que influencia diretamente na sobrevivência e no crescimento das bactérias. Segundo esses autores o bicarbonato de sódio tem ação bacteriostática, mas em associação com a lidocaína, por exemplo, tem efeito bactericida. Já Miyasaki *et al.* (1986) alega que o bicarbonato de sódio pode ter ação bactericida em bactérias Gram-negativas em altas concentrações. Segundo Xie *et al.* (2010) a ação bactericida do bicarbonato de sódio é devido a inibição da expressão de genes e supressão da síntese proteica.

O bicarbonato de sódio pode ser utilizado juntamente com a procaína, realizando-se uma solução, com o intuito de promover um tampão natural, promovendo a solvatação do fármaco, permitindo assim uma estabilidade da solução, obtendo uma alteração na degradação plasmática da procaína. Assim, a adição de bicarbonato de sódio a solução de procaína serve para tamponar o pH, solvatar o fármaco e diminuir a dor da injeção (Reuter *et al.*, 2017).

Em um estudo clínico com mais de 500.000 pessoas, tratados com aplicação de procaína intravenosa junto com o bicarbonato de sódio observou-se uma resposta clínica geral

positiva da utilização dessa solução nos pacientes, devido a sua ação analgésica, anti-inflamatória, antirreumática, anticancerígena e aumento de vitalidade (Harris, 2010; Reuter et al., 2017). Em um estudo em ratos com osteoartrite observou-se ação superior antirreumática e protetora de articulação após aplicação intra-articular dessa solução comparado com a dexametasona (Reuter et al., 2017).

2.4 Métodos complementares e outros agentes antimicrobianos

Alguns métodos complementares têm a finalidade de auxiliar o tratamento de infecções urinárias, principalmente as que apresentam resistências aos antimicrobianos (Qian – Sheng *et al.*; Zalewska -Piatek e Piatek, 2019).

Qian-Sheng *et al.* (2019) após utilizarem plasma rico em plaquetas intra-vesical em pacientes humanos com distúrbios do trato urinário inferior como ITU, verificaram aumento na função regenerativa urotelial e redução da inflamação crônica com consequente melhoria clínica em 70% dos pacientes. O mesmo efeito se espera do uso da procaína intra-vesical devido às ações antimicrobiana e anti-inflamatória seguindo os princípios da Terapia Neural (Bulcão *et al.*, 2011; Reuter *et al.*, 2017).

Tanaka *et al.* (2002) verificaram o efeito do EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e o Tris (hidroximetil-aminometano) sobre afecções de animais domésticos e silvestres, entre elas a cistite. Segundo esses autores, o EDTA aumenta a permeabilidade da parede celular bacteriana e altera a estabilidade dos ribossomos, e o Tris potencializa os efeitos do EDTA nos microrganismos, pois atua na síntese de peptidoglicano, o que impede a biossíntese da parede celular. Também EDTA - Tris potencializou a ação de outros antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes afecções (otite, cistite, endometrite, laminite, mastite, dermatite, pneumonia, abscesso, enterite, conjuntivite e onfaloflebite) de animais domésticos e silvestres. Esses mesmos autores observaram que essas mesmas amostras mostraram resistência a diversos antimicrobianos quando testadas sozinhas, mas quando adicionou o EDTA - Tris obtiveram aumento da sensibilidade. Os aminoglicosídeos, quinolonas e cefalosporinas apresentaram maior ganho de efetividade com a associação com EDTA - Tris.

De acordo com Ollin e Bartges (2015), a clorexidina, o EDTA e EDTA - Tris mostraram ação benéfica quando utilizados por via intra-vesical no homem. Segundo esses autores, a clorexidina a 0,02% mostrou diminuição da bacteriúria pós-operatória, já o EDTA -

Tris demonstrou efeito sinérgico com os antimicrobianos. Um estudo em cães mostrou que após utilizarem irrigação diária de EDTA - Tris na bexiga com cistite crônica por sete dias verificou que estes possuíam ação bactericida, mantendo a urina sem microrganismos por até 180 dias após o tratamento.

As plantas medicinais com finalidade terapêutica têm grande importância mundial, principalmente em países em desenvolvimento. A planta *Anacardium occidentale* mostrou ação antimicrobiana em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à meticilina (Silva *et al.*, 2017). Segundo Gellen e Silva (2016), a sucupira (*Pterodon emarginatus*) tem ação bactericida e fungicida, assim como a *Byrsonima crassifolia*, que possui ação bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com Araújo e Longo (2016), o orégano (*Origanum vulgare*) também possui propriedade terapêutica e ação antimicrobiana, bactericida e bacteriostática sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Kwiecińska-Piróg *et al.* (2019) após adicionarem ácido ascórbico aos antimicrobianos fluorquinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino e levofloxacino) e aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) para tratamento de cistite causada por *Proteus mirabilis*, observaram diminuição do efeito inibitório deles na formação de biofilme, já essa associação mostrou ser antagônica.

Ollin e Bartges (2015) ao utilizarem o cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) em homens com ITU verificaram que este inibe a adesão da *E. coli* na bexiga e nas células epiteliais vaginais, auxiliando assim no tratamento das cistites.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na área de controle de qualidade e pesquisa da Farmácia Casa das Fórmulas, na cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Foram utilizadas três cepas bacterianas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933. Adquiriram-se as cepas dos patógenos isoladamente de um laboratório de biossegurança. Sendo assim, não foi feito o isolamento dos patógenos dos fluidos e ou excreções de humanos ou animais. As cepas bacterianas foram compradas já previamente isoladas. Elas foram replicadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas antes da realização dos testes (Figuras 1 e 2). O ágar sangue é um meio de cultura rico em nutrientes utilizado para isolamento de microrganismos.



Figura 1. Imagem fotográfica da placa de Petri contendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 replicado em ágar sangue.



Figura 2. Imagem fotográfica da placa de Petri contendo *Escherichia coli* ATCC 25922 replicada em ágar sangue.

Foram testadas as soluções: cloridrato de procaína a 0,7%¹; bicarbonato de sódio a 0,023%²; solução contendo cloridrato de procaína 0,7% com bicarbonato de sódio 0,023%³ e solução fisiológica a 0,9%⁴. Essas soluções foram preparadas pela própria farmácia e não continham conservantes.

Para testar a ação antimicrobiana frente aos microrganismos descritos, foram utilizados dois métodos: diluição em caldo e o disco-difusão (antibiograma). Esses realizados em caldo Mueller-Hinton e em Agar Mueller-Hinton e a padronização da concentração de bactérias feita pela escala de MacFarland, de acordo com as normas da Anvisa.

Foram realizadas em triplicatas e controles: meio com inoculação do patógeno e meio sem inoculação do patógeno. E não houve crescimento microbiano nas soluções testadas, portanto não estavam contaminadas.

A solução de McFarland foi utilizada como padrão de concentração estimada de bactérias em Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Tendo como base a turbidez da escala de McFarland 0,5. A solução equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC.

Os inóculos foram preparados em capela de exaustão de fluxo contínuo, em ambiente estéril para que se evitasse a contaminação cruzada.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando se houve crescimento bacteriano no caldo (turbidez) e se houve a formação de halos de inibição ao redor dos discos, conforme CLSI (2011). Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco são mensurados em milímetros. O halo de inibição é a área sem crescimento detectável a olho nu, está relacionado à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Mas para as substâncias testadas não tem critérios interpretativos conforme CLSI.

Para o teste de caldo: A suspensão McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL) foi diluída 1:10 antes da inoculação no tubo de ensaio para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC/mL. Cada tubo de ensaio apresentava 10mL do caldo Mueller-Hinton e colocou se com alça bacteriológica 0,05 mL desse inóculo e 0,05 ml das soluções a serem testadas, cloridrato de

¹ Cloridrato de Procaína 0,7%, Casa das Fórmulas, Belo Horizonte, Minas Gerais

² Bicarbonato de Sódio 0,023%, Casa das Fórmulas, Belo Horizonte, Minas Gerais

³ Cloridrato de Procaína 0,7% com Bicarbonato de Sódio 0,023%, Casa das Fórmulas, Belo Horizonte, Minas Gerais

⁴ Solução Fisiológica 0,9%, Casa das Fórmulas, Belo Horizonte, Minas Gerais

procaína 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023%, solução de cloridrato de procaína a 0,7% com bicarbonato de sódio 0,023% e solução fisiológica a 0,9%. Cada solução em um tudo de ensaio. Após as inoculações a concentração final de bactérias nos tubos de ensaio era de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (Figura 3).

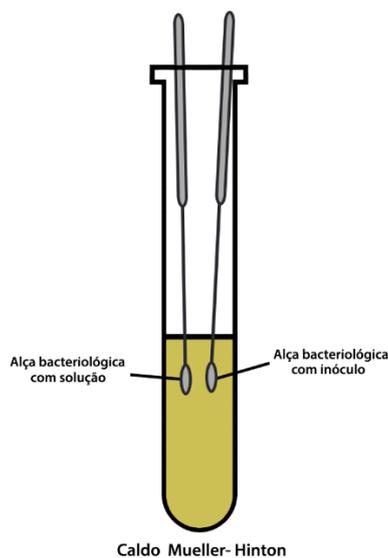


Figura 3. Esquema esquemático do teste de caldo.

Após as inoculações das bactérias e das soluções nos tubos de ensaio contendo caldo Mueller-Hinton foi realizada incubação a 37°C. Após 24 horas da incubação foi realizada a observação macroscópica dos tubos quanto à turbidez para certificar se houve ou não crescimento bacteriano.

O inóculo microbiano, a solução de MacFarland 0,5, foi semeado, na superfície das placas de Agar Mueller-Hinton com auxílio de swabs estéreis. Foi realizado um semeio em toda a placa de ponta a ponta.

As placas foram inoculadas com os microrganismos a serem testados *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Proteus mirabilis* ACTT 25933. Um microrganismo por placa. Após a inoculação com o swab, foi realizada uma pré - incubação em uma incubadora bacteriológica a uma temperatura de 36°C por 5 min.

Posteriormente, os monodiscos estéreis de papel filtro impregnados com cada solução a ser testada, cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023%, cloridrato de procaína 0,7% com bicarbonato de sódio e solução fisiológica a 0,9% foram aplicados com pinça estéril sobre a placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, com intervalo de no

mínimo 3,0 cm de distância (Figura 4). Cada placa de petri continha um disco com cada solução e foram realizadas em triplicatas. Ocorreu todo o processo de validação dos discos pela farmácia de acordo com as normativas da vigilância sanitária.

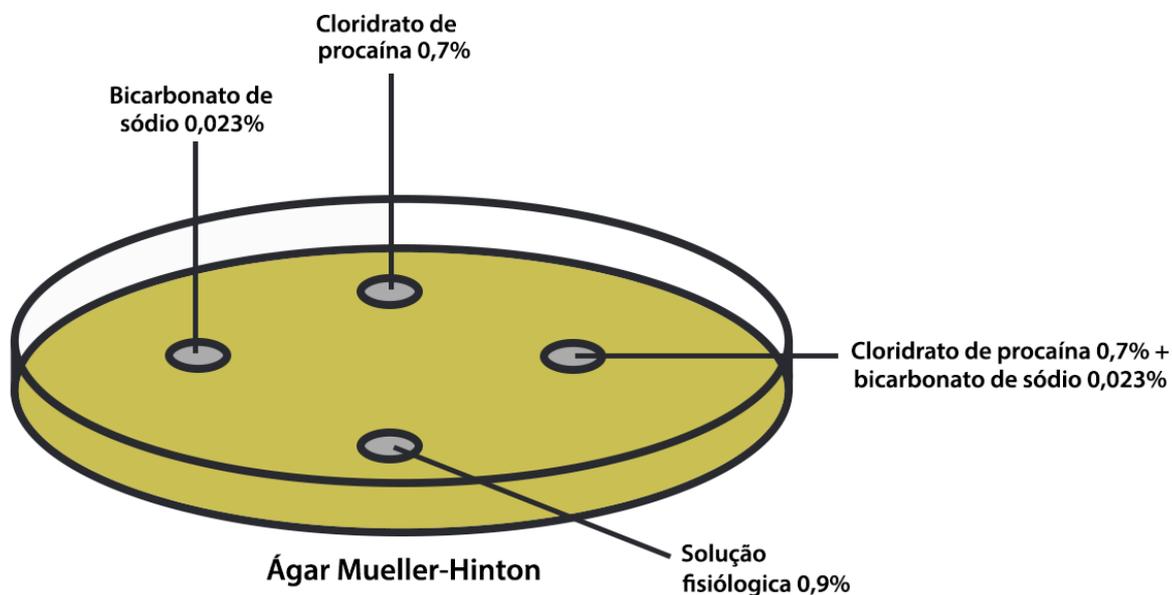


Figura 4. Desenho esquemático da placa de petri com os discos testados

Logo em seguida foi realizada a incubação a 37°C por 20 horas. Após incubação foram realizadas as medições dos halos de inibição com paquímetro a cada 24 horas durante 14 dias.

Amostras e os resultados receberam tratamento estatístico adotado pelo processo de validação da ANVISA e certificação ISO 9001. Aplicou se análise estatística descritiva da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* para serem testados neste estudo, foi decorrente desses patógenos serem, segundo Furini *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2014), os principais agentes responsáveis pelas infecções urinárias nos animais e no homem.

As soluções de cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023%, e solução de procaína acrescida de bicarbonato de sódio inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, nos testes de diluição em caldo (Tabela 1) e teste de disco-difusão (antibiograma) (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 1. Crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* no teste de diluição em caldo com uso de cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023%, solução de cloridrato de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023%.

Substância	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Cloridrato de procaína 0,7%	Não houve crescimento	Houve crescimento	Houve crescimento
Bicarbonato de sódio 0,023%	Não houve crescimento	Houve crescimento	Houve crescimento
Cloridrato de procaína 0,7% com bicarbonato de sódio 0,023%	Não houve crescimento	Houve crescimento	Houve crescimento
Solução fisiológica 0,9%	Houve crescimento	Houve crescimento	Houve crescimento

- Controle (água e o inóculo) houve crescimento bacteriano;
- Controle (somente água) não houve crescimento bacteriano.

Tabela 2. Formação de halo do *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* no teste de disco-difusão com uso de cloridrato de procaína a 0,7%, bicarbonato de sódio a 0,023% e solução de cloridrato de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023%.

Substância	<i>Bactéria</i>					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Presença Halo</i>	<i>Tamanho Halo</i>	<i>Presença Halo</i>	<i>Tamanho Halo</i>	<i>Presença Halo</i>	<i>Tamanho Halo</i>
cloridrato de procaína 0,7%	+	16,0mm	+	6,0mm	+	8,0mm
bicarbonato de sódio 0,023%	+	20,4mm	-	-	-	-
cloridrato de procaína 0,7% + bicarbonato de sódio 0,023%	+	18,0mm	+	8,0mm	-	-

Presença: +; Ausência: -

Desvio Padrão de 0,05%;

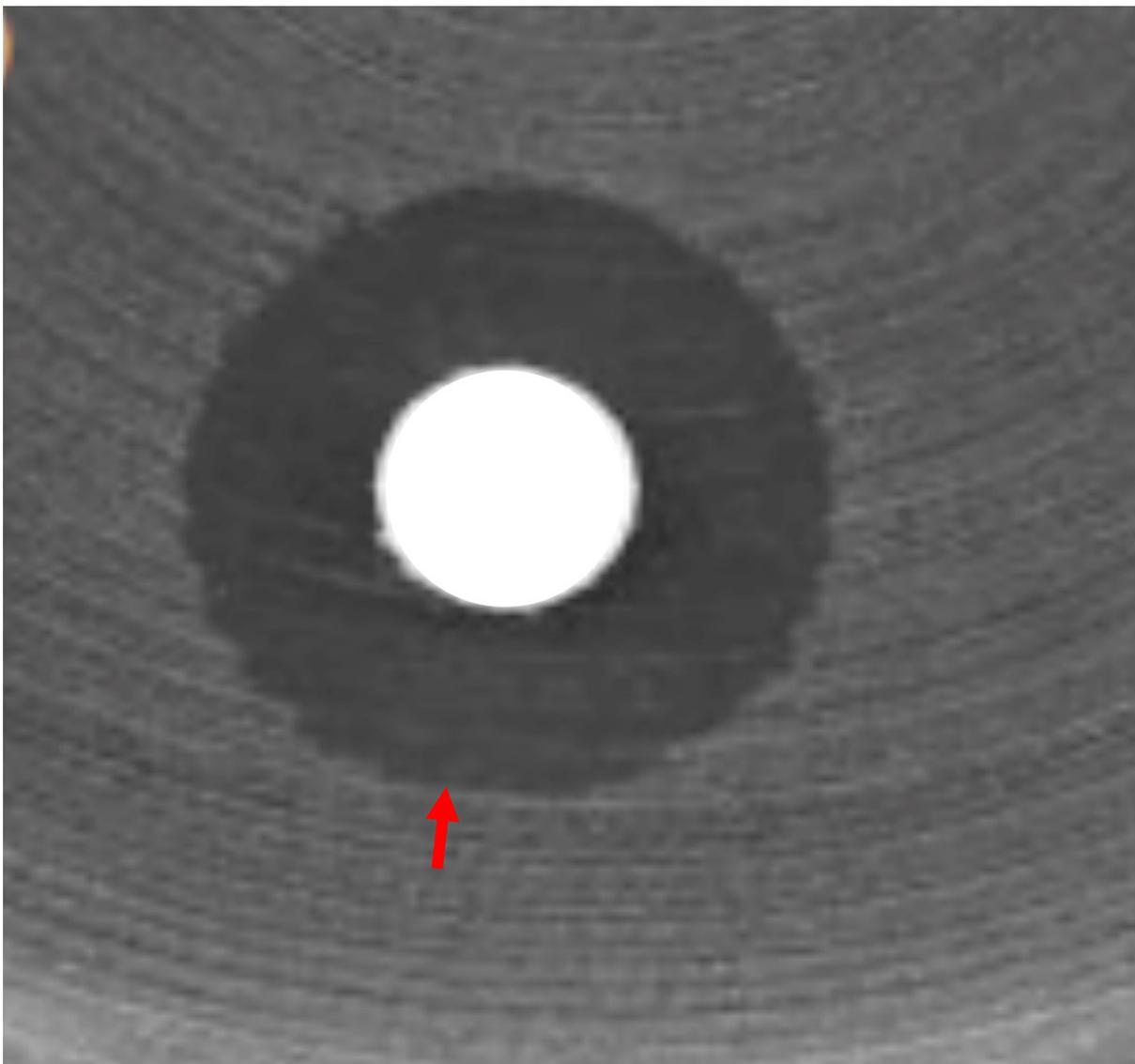


Figura 5. Imagem fotográfica da placa de Agar Mueller - Hinton inoculada com *Staphylococcus aureus*, utilizando disco de cloridrato de procaína a 0,7% para teste de disco-difusão (antibiograma). Observe formação de halo (seta vermelha) ao redor do disco.

A inibição do crescimento promovido pela procaína com relação ao *Staphylococcus aureus* foi decorrente do efeito antimicrobiano encontrado nos anestésicos locais. Esse efeito, de acordo com Johnson *et al.* (2008), pode ser decorrente da indução de efeitos em células bacterianas Gram-positivas, como aumento na desordem lipídica da membrana, com consequente aumento da fluidez e permeabilidade, induzindo assim alterações ultra estruturais. Além disso, segundo Kaewjiranai *et al.* (2018) e Kan *et al.* (2018), a ação antimicrobiana dos anestésicos locais pode ocorrer por meio da inibição da atividade da membrana respiratória, o escape de íons K^+ do interior do citoplasma bacteriano, e a interferência na síntese de DNA e RNA.

Assim, esse resultado encontrado concorda com o descrito por Pelz *et al.* (2008), que relataram que a procaína possui ação antimicrobiana contra componentes da flora oral, entre eles o *Staphylococcus aureus*. Também, de acordo com Silva *et al.* (1979), os anestésicos locais podem apresentar efeitos diretos sobre bactérias Gram-positivas, dentre os quais pode causar a inibição do crescimento. Fato observado neste estudo, já que a procaína inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus*, um microrganismo Gram-positivo. Semelhante a ação das plantas medicinais *Anacardium occidentale*, que mostrou ação antimicrobiana em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à metilicina (Silva *et al.*, 2017), e *Byrsonima crassifolia*, que possui ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* (Gellen e Silva, 2016). Achados esses que discordam do descrito por Adler *et al.* (2017), que relataram que o *Staphylococcus aureus* é o patógeno menos susceptível a ação bactericida dos anestésicos locais. Esses autores, entretanto, não testaram o anestésico procaína em seu estudo, utilizando somente os anestésicos bupivacaína, lidocaína e mepivacaína.

Além disso, neste estudo, a solução de bicarbonato de sódio também inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* (Tabelas 1 e 2), corroborando com Pinto *et al.* (2013), que descreveram que o bicarbonato de sódio possui ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *in vitro*, como o *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Esse efeito, segundo Shoichiro Ibusuki *et al.* (1998), pode ser decorrente do bicarbonato de sódio alterar o pH do meio, agindo assim como ácido fraco e base fraca dependendo do meio, aumentando o pH extracelular e diminuindo o pH intracelular. De acordo com Xie *et al.* (2010) a ação antimicrobiana do bicarbonato de sódio é devido a inibição da expressão de genes e supressão da síntese protéica.

O mesmo resultado foi encontrado ao associar a procaína e o bicarbonato de sódio em uma mesma solução (Tabelas 1 e 2). De acordo com Reuter *et al.* (2017), o bicarbonato de sódio pode ser utilizado juntamente com a procaína, realizando-se uma solução, com o intuito de promover um tampão natural, promovendo a solvatação do fármaco, permitindo assim uma estabilidade da solução, melhorando suas atuações, entre elas, o efeito antimicrobiano. Além disso, segundo Shoichiro Ibusuki *et al.* (1998) e Dokai *et al.* (2018), a adição do bicarbonato de sódio a procaína pode alterar o pH intracelular, agindo assim como bactericida natural, essa alteração de pH provoca um estresse bacteriano que influencia diretamente no crescimento das bactérias.

No teste de disco-difusão observaram-se os halos de inibição que o cloridrato de procaína e o bicarbonato de sódio promoveram com relação ao *Staphylococcus aureus*, esses estiveram presentes durante 14 dias. Indicando assim um efeito longo desses fármacos sobre o microrganismo. Sendo assim, esses fármacos poderiam ajudar no tratamento de infecções crônicas em pacientes causadas por este agente, podendo diminuir dessa forma a resistência antimicrobiana. Pois, segundo Shrestha *et al.* (2019), a terapia a longo prazo com antimicrobianos pode promover aumento da resistência a classes de antimicrobianos.

Vale ainda ressaltar que o *Staphylococcus aureus* é um microrganismo que pode apresentar resistência alta com relação a diversos antimicrobianos, como descrito por Penna *et al.* (2010) e Scherer *et al.* (2017). Necessitando muitas vezes de antimicrobianos de amplo espectro, que podem induzir a maior resistência dos microrganismos, como o caso dos carbapenêmicos (Smith *et al.*, 2018). Assim, o uso de outros agentes bactericidas, como o caso do cloridrato de procaína e do bicarbonato de sódio poderia reduzir de forma significativa o uso de agentes antimicrobianos, diminuindo conseqüentemente a resistência e a multirresistência microbiana.

Com relação ao microrganismo *Proteus mirabilis*, no teste de diluição em caldo, as substâncias cloridrato de procaína, bicarbonato de sódio e a solução de procaína acrescida de bicarbonato, não inibiram o seu crescimento (Tabela 1 e figura 6).



Figura 6. Imagem fotográfica do tubo de ensaio contendo caldo Mueller-Hinton, *Proteus mirabilis* e solução de cloridrato de procaína a 0,7% acrescida de bicarbonato de sódio a 0,023% para teste de diluição em caldo. Observe presença de turbidez na solução (seta vermelha).

Entretanto, no teste do disco-difusão (antibiograma) encontrou-se formação de halo (Tabela 2), indicando assim inibição do crescimento desse patógeno quando se utilizou o cloridrato de procaína e a solução de cloridrato de procaína acrescida de bicarbonato de sódio. Esses resultados divergentes são provavelmente decorrentes da diferença de sensibilidade entre os testes. De acordo com Araujo (2007) e Bona *et al.* (2014), o método de diluição em caldo utilizado no estudo mede quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Contudo, o antibiograma ou disco-difusão é o mais utilizado na rotina, pois mede qualitativamente a atividade antimicrobiana *in vitro*. Assim sendo, o teste de antibiograma é mais efetivo, segundo os parâmetros de análise microbiológica (Antunes, *et al.* 2006; Remonatto, 2006). Por essa razão foram realizados os dois testes no experimento, um quantitativo e outro qualitativo.

Deste modo, o cloridrato de procaína e solução de cloridrato de procaína acrescida por bicarbonato de sódio testadas neste estudo inibiram o crescimento do *Proteus mirabilis*, possuindo uma inibição de crescimento por 48h, pois após este período notou-se o desaparecimento do halo de inibição. Concordando com o relatado por Johnson *et al.* (2008), que descreveram que os anestésicos locais possuem atividade bacteriostática e bactericida, por meio da indução de efeitos em células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo Labedan (1988), em bactérias Gram-negativas, como o *Proteus mirabilis*, os anestésicos locais podem induzir alterações na fluidez da membrana citoplasmática e induzir inibição de crescimento bacteriano. E segundo Dokai *et al.*, (2018) a ação do bicarbonato de sódio pode ser potencializada em associação com outro antimicrobiano, como um anestésico local.

Já, o bicarbonato de sódio não inibiu o crescimento desse microrganismo em nenhum dos dois testes (Tabelas 1 e 2). Labedan (1988) relataram que a membrana externa de uma bactéria Gram-negativa confere uma barreira hidrofóbica adicional dificultando a penetração de algumas substâncias o que confere maior resistência ao patógeno. Sendo assim, pode ter causado a falta de atuação do bicarbonato de sódio sobre o *Proteus mirabilis*, mesmo este tendo atuado sobre os *Staphylococcus aureus*, mas este é Gram-positivo. Também Kwiecińska-Piróg *et al.* (2019) não notaram aumento na eficiência de antibióticos contra o *Proteus mirabilis* após terem adicionados ácido ascórbico, para tratamento de cistite no homem.

É preciso ressaltar que o *Proteus mirabilis* é um dos microrganismos mais comuns nas infecções urinárias (Marques *et al.*, 2019), e que apresenta alta resistência a diversos antimicrobianos, devido sua capacidade de formar biofilme (Kwiecińska-Piróg *et al.*, 2019). Assim, a utilização do cloridrato de procaína no tratamento de infecções urinárias causadas por este patógeno, poderia agir de forma sinérgica com os antimicrobianos. Pois de acordo com Labedan (1988), em bactérias Gram-negativas, os anestésicos locais são capazes de tornar a membrana externa permeável a antibióticos aos quais normalmente é resistente, além de induzir alterações na fluidez da membrana citoplasmática e induzir inibição de crescimento.

Com relação ao microrganismo *Escherichia coli* (*E. coli*), no teste de diluição em caldo, as substâncias cloridrato de procaína, bicarbonato de sódio e a solução de procaína acrescida de bicarbonato de sódio, não inibiram o seu crescimento (Tabela 1). Entretanto, no teste do disco-difusão (antibiograma) encontrou-se formação de halo (Tabela 2 e figura 7),

indicando assim inibição do crescimento desse patógeno quando se utilizou a solução de cloridrato de procaína a 0,7%. Esses resultados divergentes são provavelmente decorrentes da diferença de sensibilidade entre os testes. Segundo Remonato (2006), o teste antibiograma é mais efetivo, pois se avalia qualitativamente a atividade antimicrobiana, como descrito acima para o microrganismo *Proteus mirabilis*.

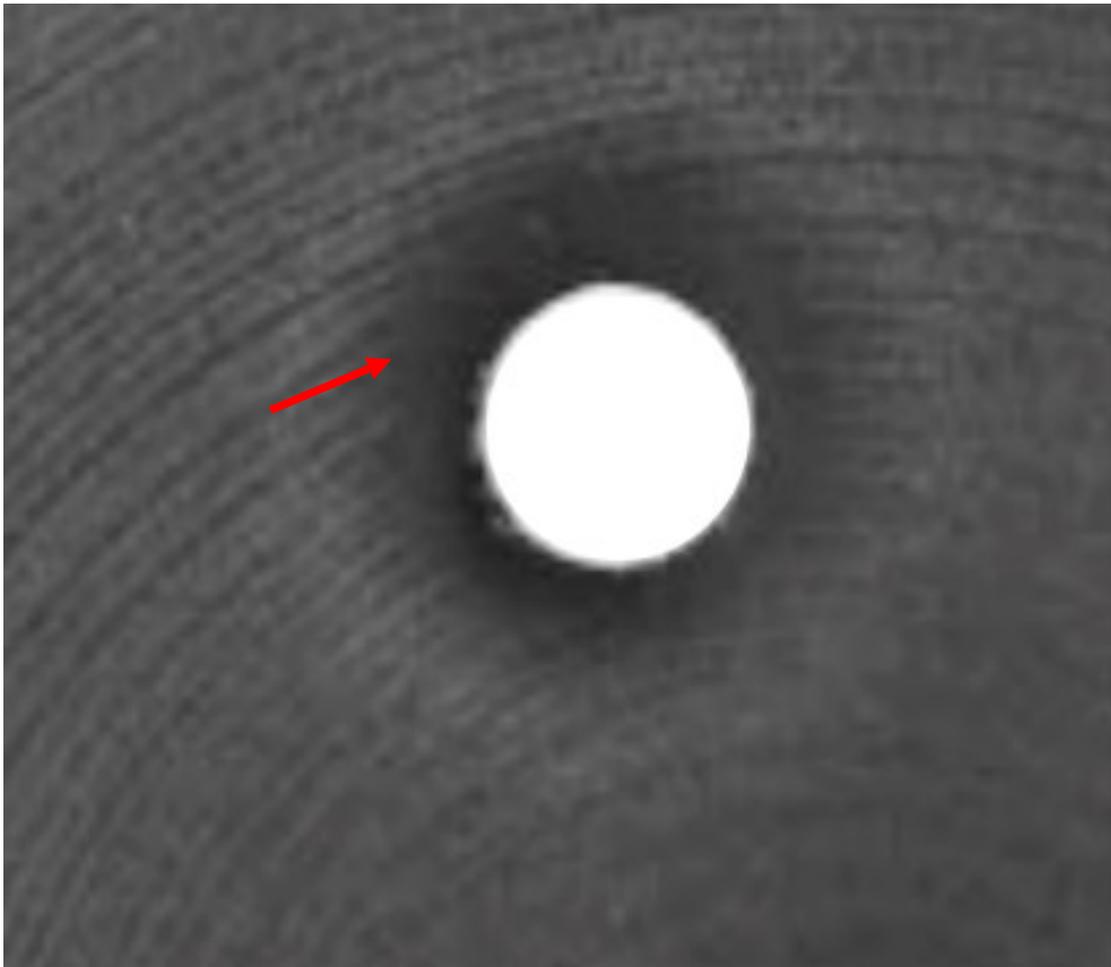


Figura 7. Imagem fotográfica da placa de Agar Mueller - Hinton inoculada com *Escherichia coli*, utilizando disco de cloridrato de procaína a 0,7% para teste de disco-difusão (antibiograma). Observe formação de halo (seta vermelha) ao redor do disco.

Assim, cloridrato de procaína neste estudo inibiu o crescimento do *E. coli*, possuindo uma inibição de crescimento por 72h, pois após este período notou-se o desaparecimento do halo de inibição. Esse resultado concorda com o descrito por Labedan (1988), onde constatou que os anestésicos locais inibiram células de *E. coli* de tipo selvagem. Também com Adler *et al.* (2017), os quais demonstraram a ação antimicrobiana dos anestésicos locais *in vitro* contra as bactérias *E. coli* produtoras de beta-lactamase. Segundo Lazdunski *et al.* (1979), esse efeito

antimicrobiano é decorrente de promover inibição do processamento de precursores de proteínas da membrana externa da *E. coli*. Contudo, Pelz *et al.* (2008), verificaram que o cloridrato de procaína apresentou menor atividade antimicrobiana, inibiu 47% das espécies bacterianas testadas, entre elas *E. coli*.

Desta forma, a associação do cloridrato de procaína ao tratamento das infecções urinárias por *E. coli* pode colaborar para melhorar a eficácia dos antimicrobianos contra esse agente. Pois de acordo com estudo de Siqueira *et al.* (2008), nas infecções urinárias por *E. coli* em cães, pode encontrar este patógeno com resistência a pelo menos três antimicrobianos.

Entretanto, a solução de cloridrato de procaína acrescida ao bicarbonato de sódio e a solução de bicarbonato de sódio não inibiram o crescimento desse microrganismo em nenhum dos dois testes (Tabelas 1 e 2). Contrariando o descrito por Thornton *et al.* (2018), os quais relataram que a solução contendo sódio poderia causar inibição do crescimento da *E. coli*. Mas segundo Xie *et al.* (2010) o bicarbonato de sódio só terá ação em *E. coli* em altas concentrações. Contudo, talvez o bicarbonato de sódio quanto isolado ou associado à procaína pode ter agido como ácido fraco, como descrito por Shoichiro Ibusuki *et al.* (1998), colaborando dessa forma para a multiplicação da *E. coli*, que de acordo com Thornton *et al.* (2018), o meio ácido pode favorecer a sua multiplicação. E cada patógeno tem a sua resposta individual diante do bicarbonato de sódio conforme descrito por Dokai *et al.* (2018).

5 CONCLUSÕES

Com base neste estudo pode-se concluir que:

- O cloridrato de procaína a 0,7% possui ação antimicrobiana *in vitro* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*.

- O bicarbonato de sódio a 0,023% teve ação antimicrobiana *in vitro* somente contra *Staphylococcus aureus*.

- A associação do cloridrato de procaína e o bicarbonato de sódio teve ação antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, não apresentando efeito em relação a *Escherichia coli*.

Contudo, a eficácia dos anestésicos locais *in vivo* precisa ser aprofundada. Essas observações servirão de base para o tratamento do sistema urinário pela Terapia Neural e desenvolvimento de mais trabalhos clínicos *in vivo* em humanos e animais.

Seria interessante testar outros anestésicos locais e outras concentrações com o objetivo de averiguar a sensibilidade bacteriana. Pela primeira vez os discos de anestésicos locais foram utilizados. É um tratamento de baixo custo perante outros antimicrobianos.

O resultado deste experimento mostra uma possibilidade para o tratamento *in vivo* intra - vesical de cistites sensíveis a anestésicos locais e possíveis associações com outros antimicrobianos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, D.M.T.; DAMBORG, P.; VERWILGHEN, D.R. The antimicrobial activity of bupivacaine, lidocaine and mepivacaine against equine pathogens: An investigation of 40 bacterial isolates. *The Veterinary Journal*. p. 27-31, 2017.
- ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V. *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(4), Out. /Dez., p. 517-524, 2006.
- ARAÚJO, C.R. *Testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para avaliação da suscetibilidade in vitro de dermatófitos*. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.
- ARAÚJO, M.M.; LONGO, P.L. Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivos Instituto Biológico*. v. 83, p. 1-7, 2016.
- BAHR ARIAS, M.V.; ASSIS BATTAGLIA, L.; AIELLO, G. *et al.* Identificação da susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. *Semina: Ciências Agrárias*. Universidade Estadual de Londrina.v.29, n.4, outubro-dezembro, p.861-874, 2008.
- BAN AL-SAYYED, M.D.; JEREMY Le, M.D.; MOHAMMAD MOUSBAH AL-TABBAA, M.D. *et al.* Uncomplicated Urinary Tract Infection in Ambulatory Primary Care Pediatrics: Are We Using Antibiotics Appropriately? *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. v. 24, n. 1, p. 39-44, 2019.
- BARTGES, J.W. Diagnosis of urinary tract infections. *Veterinary Clinics: Small Animal*. 34, p.923-933, 2004.
- BIELLEN, L.; LIKIC, R. Experience with fosfomicina in the treatment of complicated urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. v. 6, p. 1-11, 2019.
- BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, T.K. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos de vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos Instituto Biológico*., v.81, n.3, p.218-225, 2014.
- BULCÃO, R.P.; ARBO, M.D.; ROEHR, M. *et al.* Procaína: Efeitos farmacológicos e toxicológicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 32, n.3, p. 297- 303, 2011.
- BURREL S.E. *Salud, enfermería y terapia neural. Trabajo presentado al curso de Administración y Gestión en Cuidados de Enfermería para la obtención del Máster*. Escuela universitaria de enfermería santa madrona. Barcelona.p.193, 2008.

BRAIBANTE, P.S. *Frequência de infecção trato urinário de felinos atendidos no hospital de clínicas veterinárias da ufgrs*. Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária. Porto Alegre. p. 35, 2013.

BRAVO-MONSALVO, A.; VÁZQUEZ-CHAGOYAN, J.C.; GUTIÉRREZ, L.; SUMANO, H. Clinical Efficacy of Neural Therapy for the Treatment of Atopic Dermatitis in Dogs. *Acta Veterinaria Hungarica*. v. 56, n. 4, p.459-469, 2008.

CARVALHO, V.M.; SPINOLA, T.; TAVOLARI, F. *et al.* Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: etiologia e resistência aos antimicrobianos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 34, n.1, p.62-70, janeiro, 2014.

CASTRO, R.A. *Bases para la terapia neural em caninos y felinos*. Buenos Aires: Dunken, 2011. 304p.

DOKAI, O.; LAUB, K.; STERCZ, B. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. v. 9, p. 1-12, 2018.

FERREIRA, M.C.; NOBRE, D.; OLIVEIRA, M.G.X. *et al.* Agentes bacterianos isolados de cães e gatos com infecção urinária: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. *Atas de saúde ambiental –Asa*. V.2, n.2, p.29-37, Maio/Ago, 2014.

FISCHER, L. *Terapia Neural, según Huneke. Fundamentos, técnica, aplicación práctica*. México: Hippokrates Verlag Stuttgart, 2000. 272p.

FONGARO, J. *Identificação microbiana de urocultura*. Trabalho apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, como exigência para obtenção de título de licenciado em Ciências Biológicas. Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, p.12, 2011.

FURINI, A.A.C.; SILVA, B.T.O.S.; CHIAPARINI, J. *et al.* Análise epidemiológica, identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos isolados de cães com infecção do trato urinário. *Acta Veterinaria Brasílica*. v. 7, n.4, p. 288-293, 2013.

GELLEN, L.A.A.; SILVA, E.H.C. Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*. *Journal of Bioenergy Food Science*. v. 03, n. 2, p. 63-71, 2016.

GONÇALVES, B.A.L.; FREITAS, P.M.C. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG. SYMPOSIUM INTERNACIONAL ON VETERINARY SCIENCE. Viçosa, Novembro, 2019.

HARRIS, G.R. Effective Treatment of Chronic Pain by the Integration of Neural Therapy and Prolotherapy. *Journal of Prolotherapy*. v. 2, n. 2, p.377-386, May, 2010.

JOHNSON, S.V.; SAINT JOHN, B.E.; DINE, A.P. Local Anesthetics as Antimicrobial Agents: A Review. *Surgical Infections*. v.9, n.2, p.205-213, 2008.

KAEWJIARANAI, T.; SRISATJALUK, R.L.; SAKDAJEYONT, W. *et al.* The efficiency of topical anesthetics as antimicrobial agents: A review of use in dentistry. *Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine*. v.18, n.4, p. 223-233, 2018.

- KAN, L.; LIYAN, Y.; WEI, S. *et al.* Does Use of Lidocaine Affect Culture of Synovial Fluid Obtained to Diagnose Periprosthetic Joint Infection (PJI)? An *In Vitro* Study. *Medical Science Monitor*. 24, p. 448-452, 2018.
- KLEINFELD, J.; ELLIS, P.P. Inhibition of Microorganisms by Topical Anesthetics. *Applied Microbiology*. v. 15, n. 6, p. 1296-1298, 1967.
- KUKANICH, K.; LUBBERS, B.; SALGADO, B. Amoxicillin and amoxicillin – clavulanate resistance in urinary *Escherichia coli* antibiograms of cats and dogs from the Midwestern United States. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. p. 1-5, 2019.
- KWIECIŃSKA-PIRÓG, J.; SKOWROM, K.; BOGIEL, T. *et al.* Vitamina C in the Presence of Sub-Inhibitory Concentration of Aminoglycosides and Fluoroquinolones Alters *Proteus mirabilis* Biofilm Inhibitory Rate. *Antibiotics*. v. 6, n. 116, p. 1-12, 2019.
- LABEDAN, B. Increase in Permeability of *Escherichia coli* Outer Membrane by Local Anesthetics and Penetration of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.32, n.1, p.153-155, Jan, 1988.
- LACERDA, G.L. *Biofilmes microbianos e resistência a antibióticos*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 38, 2013.
- LAZDUNSKI, C.; BATY, D.; PAGES, JM. Procaine, a Local Anesthetic Interacting with the Cell Membrane, Inhibits the Processing of Precursor Forms of Periplasmic Proteins in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 96, p. 49-57, 1979.
- LEUNG, Y.W.; RAWAL B.D. Mechanism of Action of Tetracaine Hydrochloride against *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 136, n. 5, p. 679-683, 1977.
- LEVRAUT, J.; LABIB, Y.; CHAVE, S. *et al.* Effect of sodium bicarbonate on intracellular pH under different buffering conditions. *Kidney International*.v. 49, p. 1261-1267, 1996.
- MAJEED, H.T.; ALJANABY, A. A. J. Antibiotic Susceptibility Patterns and Prevalence of some Extended Spectrum Beta-Lactamases Genes in Gram – Negative Bacteria Isolated from Patients Infected with Urinary Tract Infections in al-Najaf City, Iraq. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. v. 11, n. 2, p. 192- 201, 2019.
- MARQUES, C.; BELAS, A.; ABOIN, C. *et al.* Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans. *Veterinary Microbiology*. 228, p. 77-82, 2019.
- MENANO MAIA, F.P.R. *Caracterização do crescimento bacteriano e a susceptibilidade antimicrobiana em infecções do tracto urinária em cães*. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, p. 56, 2016.
- MIYASAKI, K. T.; GENCO, R.J.; WILSON, M.E. Antimicrobial Properties of Hydrogen Peroxide and Sodium Bicarbonate Individually and in combination Against Selected Oral, Gram-negative, Facultative Bacteria. *Journal of Dental Research*. v. 65, n. 9, p. 1142-1148, 1986.

- NAVANEETH, N.; CHRISTOPHER, D.A.; KUBIAK, D.W. *et al.* Evaluation of treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the obese patient. *Infection and Drug Resistance*. v. 12, p. 877-891, 2019.
- NETO, J. A.D.; SILVA, L. D. M.; MARTINS, A. C. P. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 18, n. 5, p. 36-38, 2003.
- OLLIN, S. J.; BARTGES, J. W. Urinary Tract Infections, Treatment/Comparative Therapeutics. *Veterinary Clinics: Small Animal*. v. 45, p. 721-746, 2015.
- PENNA, B.; VARGES, R.; MARTINS, R. *et al.* In vitro antimicrobial resistance of *Staphylococci* isolated from canine urinary tract infection. *Canadian Veterinary Journal*. v. 51, p. 738-742, July 2010.
- PELZ, K.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; BOGDAN, C.; OTTEN, J-E. Analysis of the antimicrobial activity of local anesthetics used for dental analgesia. *Journal of Medical Microbiology*. 57, p. 88-94, 2008.
- PINTO, A.T.M.; SILVA, D.J.; RIBEIRO, A.S.C.; PEIXOTO, I.T.A. Atividade antimicrobiana de Dentifrícios Fitoterápicos contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*. v.15, n.4. p.259-63, 2013.
- PÓVOA, C.P. *Perfil de resistência das bactérias gram-negativas comumente associadas à infecções do trato urinário em idosos em Goiânia – GO, no período de 2011-2015*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde. p. 55, 2016.
- QIAN-SHENG, K.; JIA-FONG, J.; TENG-YI, L. *et al.* Therapeutic potencial of intravesical injections of platelet-rich plasma in the treatment of lower urinary tract disorders due to regenerative deficiency. *Tzu Chi Medical Journal*. v. 31, n. 3, p. 135-143, 2019.
- RECHE JUNIOR, A. A orbifloxacina no tratamento das cistites bacterianas em gatos domésticos. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 35, n.6, p.1325 – 1330, nov – dez, 2005.
- REMONATTO, G. *Correlação entre concentração inibitória mínima e níveis urinários de antimicrobianos para o tratamento de infecções do trato urinário*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre. p. 56, 2006.
- REUTER, U.R.M., OETTMEIER, R., NAZLIKUL, H. Procaine and Procaine-Base-Infusion: A Review of the Safety and Fields of Application after Twenty Years of Use. *Sciforschen Clinical Research*. v. 4, n.1, 2017.
- SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COSTA-VAL, A.P. Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. *Medvep Dermato – Revista da Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*. v. 4, n. 13, p. 12-20, 2017.

SHOICHIRO IBUSUKI, M.D.; HIROSHI KATSUKI, M.D.; MAYUMI TAKASAKI, M.D. The Effects of Extracellular pH with and without Bicarbonate on Intracellular Procaine Concentrations and Anesthetic Effects in Crayfish Giant Axons. *Anesthesiology*. v. 88, n. 6, p.1549-1557, 1998

SHRESTHA, L. B.; BARAL, R.; KHANAL, B. Comparative study of antimicrobial resistance and biofilm formation among Gram-positive uropathogens isolated from community-acquired urinary tract infections and catheter-associated urinary tract infections. *Infection and Drug Resistance*. v. 12, p. 957-963, 2019.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 17, n. 4, p. 572-577, out/dez 2017.

SILVA, M.T.; SOUSA, J.C.F.; POLÓNIA, J.J.; MACEDO, P.M. Effects of Local Anesthetics on Bacterial Cells. *Journal of Bacteriology*. v. 137, n. 1, p.461-468, Jan, 1979.

SMITH, A.; WAYNE, A.S.; FELLMAN, C.L.; ROSENBAUM, M.H. Usage patterns of cabapenam antimicrobials in dogs and cats at a veterinary tertiary care hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. p. 1-9, 2019.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T. *et al.* Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, v. 60, n. 5, p-1263-1266, 2008.

SONCCO, N. I. G.; MAMANI, W.J. *Evaluación del crecimiento bacteriano y efecto buffer en el ph salival por el uso de bicarbonato de sodio, en estudiantes de pre-clínicas de odontología una-puno-2018*. Tesis presentada para optar el título profesional de: cirujano dentista. Universidad nacional del altiplano facultad de ciencias de la salud escuela profesional de odontología. Peru. p.99, 2018.

TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; LISTONI, F.J.P. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. v. 54, n. 3, p. 331- 334. 2002.

THOMPSON, M.F.; LITSTER, A.L.; PLATELL, J.L.; TROTT, D.J. Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. *The Veterinary Journal*. 190, p. 22-27, 2011.

THORNTON, L.A.; BURCHELL, R.K.; BURTON, S.E. *et al.* The Effect of Urine Concentration and pH on the Growth of *Escherichia Coli* in Canine Urine In Vitro. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.32, p. 752-756, 2018.

TRABULSI, L.R, ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 6 edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 579p.

XIE, C.; TANG, X.; XU, W. *et al.* A Host Defense Mechanism Involving CFTR-Mediated Bicarbonate Secretion in Bacterial Prostatitis. *Plos One*. v. 5, n. 12, p. 1- 13, 2010.

XU, J.; HE, F. Characterization of NDM -& carbapenemase – producing *Escherichia coli* ST410 clinical strain isolated from a urinary tract infection in China. *Infection and Drug Resistance*. v. 12, p.1555- 1564, 2019.

ZALEWSKA – PIATEK, B.; PIATEK, RAFAL. Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta Biochimica Polonica*. v. 66, n. 2, p. 129-138, 2019.

WEESE, J.S.; GIGUÈRE, S.; GUARDABASSI, P.S. *et al.* ACVIM Consensus Statement on Therapeutic Antimicrobial Use in Animals and Antimicrobial Resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.29, p. 487-498, 2015.

WEESE, J.S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D. *et al.* International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. *The Veterinary Journal*. 247. p- 8-25, 2019.

WEIS, S.; KESSELMEIER, M.; DAVIS, J.S.; MORRIS, A. M. *et al.* Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for the treatment of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Microbiology and Infection*. p. 1-10, 2019.

WONG, C.; EPSTEIN, S.E.; WESTROPP, J.L. Antimicrobial Susceptibility Patterns in Urinary Tract Infections In dogs (2010 – 2013). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 29, p. 1045-1052, 2015.