

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
**Mestrado**

GABRIELLE GUEDES COUTINHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS  
FITOQUÍMICOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE  
FOLHAS DE URUCUM (*Bixa orellana*) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
BEXIGA NEUROGÊNICA**

São Luís – MA

2022

GABRIELLE GUEDES COUTINHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS  
FITOQUÍMICOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE  
FOLHAS DE URUCUM (*Bixa orellana*) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
BEXIGA NEUROGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa

São Luís – MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Guedes Coutinho, Gabrielle.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS  
FITOQUÍMICOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE  
FOLHAS DE URUCUM Bixa orellana EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
BEXIGA NEUROGÊNICA / Gabrielle Guedes Coutinho. - 2022.

75 p.

Coorientador(a): Eduardo Martins de Sousa.

Orientador(a): Rafael Cardoso Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís MA, 2022.

GABRIELLE GUEDES COUTINHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS  
FITOQUÍMICOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE  
FOLHAS DE URUCUM (*Bixa orellana*) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
BEXIGA NEUROGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 06 / 05 / 2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof(a). Dr(a). Maria do Socorro de Sousa Cartágenes**  
**Universidade Federal do Maranhão**

---

**Prof(a). Dr(a). Rachel Melo Ribeiro**  
**Universidade Federal do Maranhão**

---

**Prof(a). Dr(a). Joicy Cortez de Sá**  
**Universidade CEUMA**

---

**Prof(a) Dr(a). Renata Mondêngo de Oliveira**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me abençoou e permitiu que coisas maravilhosas acontecessem ao longo da minha vida. Independentemente de qualquer problema e imprevistos, eu sempre carreguei em meu coração a certeza de que no final as coisas vão dar certo e acontecerão da forma que Deus permitir.

Agradeço imensamente a minha família e principalmente a minha mãe, Klaudilene Guedes, e minha tia, Dellene Cutrim, por serem o meu verdadeiro alicerce e servirem de grandes exemplos de mulheres fortes, independentes, muitíssimo inteligentes, e tudo aquilo que eu poderia almejar ser. Obrigada por acreditarem e lutarem tanto pelo meu futuro. Em memória da minha vó, que não está mais entre nós, agradeço a ela por ter me amado tanto durante sua vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Rafael Cardoso Carvalho, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e motivação durante essa jornada. Eu não poderia ter tido orientação melhor para passar por todo esse processo. Agradeço muitíssimo pela chance que me foi concedida de conhecer uma pessoa capaz de cativar e encantar qualquer um com toda sua educação e gentileza.

E ao meu coorientador professor Dr. Eduardo Martins de Sousa, pela sua disponibilidade e suporte em todas as etapas desse projeto. Agradeço por me receber em seu laboratório desde o momento em que concluí a graduação, e por sempre me abrir portas oferecendo oportunidades e direcionando essa trajetória acadêmica.

Agradeço a professora Cláudia Quintino e a professora Rachel Ribeiro, pela disponibilidade de participarem diretamente em etapas importantes desse projeto, e colaboração ao longo de todo o trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias (LIMIR) da Universidade CEUMA que me ajudaram e estiveram comigo ao longo deste trabalho, participando de forma direta ou indiretamente: Aline Rezende, Daniel Pontes, Danilo Moraes, Felipe Lobato, Rayana Ferreira, Roberval Nascimento, Raquel Rocha. Acrescento a esta lista uma amiga que mesmo fazendo parte de outro laboratório nunca se mostrou indisponível para ajudar quando eu precisei, Haryne Furtado. Faço ainda um agradecimento especial a melhor amiga que alguém poderia ter, Aline Rezende.

Não apenas uma amiga de laboratório, mas uma amiga de vida, que sempre esteve comigo nos altos e baixos de todos os ciclos que já vivemos juntas. Essa com certeza não será nossa última história, ainda planejamos nosso doutorado fora do país! A todos muito obrigada por todos os momentos e palavras de motivação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (UFMA), e aos professores que fazem parte do programa, que me moldaram durante este tempo, e auxiliaram no meu crescimento.

Por fim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória.

“Daqui a um tempo nós teremos que escolher  
entre o que é certo e o que é fácil.”

(Alvo Dumbledore)

## RESUMO

A Bexiga Neurogênica (BN) ou disfunção neurogênica do trato urinário inferior é um problema médico e social decorrente da comunicação neural anormal entre a bexiga e o sistema nervoso. Independentemente da etiologia, é comum que os pacientes com BN apresentem infecções recorrentes do trato urinário. Esta disfunção têm uma relevância clínica e física na qualidade de vida em pacientes acometidos por ela. Desta forma, baseado na importância do tratamento das infecções bacterianas que afetam pacientes com BN torna-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas, e os antimicrobianos originados de plantas apresentam-se como prática terapêutica favorável. Isto posto, objetivou-se com esta pesquisa realizar análises *in vitro* e *in vivo* da fração Acetato de Etila das folhas de *Bixa Orellana* (BoEA), e do composto isolado da fração, o ácido elágico contra microrganismos causadores de cistite neurogênica em modelo experimental de bexiga neurogênica em ratos, através do protocolo cirúrgico experimental por transecção completa da medula espinhal. Os resultados *in vitro* demonstraram que a BoEA apresentou a Concentração Inibitória e Bactericida Mínima de 6,25 mg/mL, enquanto o ácido elágico, CIM e CBM de 25 mg/mL contra a *E. coli* isolada no modelo experimental. Nos ensaios *in vivo*, O grupo BoEA (50mg/kg) não demonstrou diferença estatística dos parâmetros hematológicos quando comparado ao grupo controle negativo. O grupo associação (ácido elágico com antibiótico) demonstrou maior eficácia dentre os tratamentos propostos. Quanto a urinálise, os grupos tratados com ácido elágico, e com a associação tiveram melhoria substancial nestes parâmetros. No ensaio de UFC, pode-se evidenciar que todos os tratamentos propostos foram capazes de reduzir o número de colônias, comprovando-se a eficácia terapêutica do ácido elágico e de sua associação com antibiótico para tratamento de infecções por *E.coli*. Desta forma, este trabalho pode contribuir no processo de busca de alternativas terapêuticas com o uso de plantas medicinais, principalmente com o uso da *B. orellana* e de seus compostos fotoquímicos para o tratamento de infecções urinárias decorrentes do quadro de bexiga neurogênica.

**Palavras-chave:** Urucum; Disfunção neurogênica do trato urinário inferior; Bexiga neuregênica; Bioprospecção; Ácido Elágico.

## ABSTRACT

Neurogenic Bladder (BN) or lower urinary tract neurogenic dysfunction is a medical and social problem resulting from abnormal neural communication between the bladder and the nervous system. It is common for patients with BN to have recurrent urinary tract infections. This dysfunction has clinical and physical relevance in the quality of life of patients affected by it. Based on the importance of treating bacterial infections that affect patients with BN, it becomes necessary to search for new therapeutic alternatives, and antimicrobials originating from plants are presented as a favorable therapeutic practice. The objective of this research was to perform *in vitro* and *in vivo* analyzes of the Ethyl Acetate fraction from *Bixa Orellana* leaves (BoEA), and the compound isolated from the fraction, ellagic acid against microorganisms that cause neurogenic cystitis in an experimental model of neurogenic bladder in rats, through the experimental surgical protocol by complete spinal cord transection. The *in vitro* results showed that BoEA had a Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentration of 6.25 mg/mL, while ellagic acid, MIC and CBM of 25 mg/mL against *E. coli* isolated in the experimental model. In *in vivo* assays, the BoEA group (50mg/kg) showed no statistical difference in hematological parameters when compared to the negative control group. The association group (ellagic acid with antibiotic) showed greater efficacy among the proposed treatments. As for urinalysis, the groups treated with ellagic acid and with the association had substantial improvement in these parameters. In the CFU assay, it can be seen that all the proposed treatments were able to reduce the number of colonies, proving the therapeutic efficacy of ellagic acid and its association with antibiotics for the treatment of *E.coli* infections. This work can contribute to the process of searching for therapeutic alternatives with the use of medicinal plants, mainly with the use of *B. orellana* and its photochemical compounds for the treatment of urinary infections resulting from neurogenic bladder.

**Key words:** *Bixa orellana*; Neurogenic Bladder; Cystitis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A.U</b>	Unidades Arbitrárias
<b>BAS</b>	Bacteriúria Assintomática
<b>BoEA</b>	Fração Acetato de Etila
<b>BoHE</b>	Extrato Bruto Hidroalcoólico
<b>BN</b>	Bexiga Neurogênica
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CFU</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>CI</b>	Cateterismo Intermitente
<b>CIL</b>	Cateterismo Intermitente Limpo
<b>CIM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DNTUI</b>	Disfunção Neurogênica do Trato Urinário inferior
<b>EH</b>	Extrato hidroalcoólico
<b>ESI/MS</b>	Espectrometria de Massas
<b>EUA</b>	European Urological Association
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo
<b>He</b>	Hélio
<b>ICS</b>	International Continence Society
<b>ITU</b>	Infecções do Trato Urinário
<b>LM</b>	Lesão Medular
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography
<b>TMP-SMX</b>	Trimetoprim-sulfametoxazol
<b>WBCs</b>	Glóbulos Brancos

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de compostos fitoquímicos isolados de sementes e folhas do extrato de <i>Bixa orellana</i> L. (Urucum).....	19
Tabela 2. Rendimento dos grupos de frações (G1- G10) da fração acetato de etila (BoEA) do extrato de <i>B. orellana</i> .....	37
Tabela 3. Caracterização química do grupo 10 (G10), substância identificada como ácido elágico (elagitanino).....	39
Tabela 4. Determinação das concentrações inibitórias e bactericida mínimas da fração acetato de etila (BoEA) e grupos de frações contra amostra de <i>E. coli</i> .....	40
Tabela 5. Parâmetros hematológicos analisados do grupo controle negativo (CN) e grupos de animais tratados durante três dias.....	42
Tabela 6. Teste urinário com fita reagente urinálise - análise física e química realizada nos diferentes grupos experimentais de acordo com os períodos experimentais proposto.....	46
Tabela 7. Sedimentoscopia realizada nos diferentes grupos experimentais de acordo com os períodos experimentais proposto.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Laminectomia – técnica cirúrgica de transecção medular completa e recuperação anestésica. ....	31
Figura 2: Teste de motricidade de BBB - Basso, Beattie e Bresnahan.. ....	32
Figura 3: Cromatogramas obtidos no método exploratório para cada grupo de frações, bem como os espectros representativos para cada pico, obtidos na região do UV. ....	38
Figura 4: Perfil cromatográfico, espectro de fragmentação (ESI) para ácido elágico e estrutura do composto da fração pura (G10) .....	39
Figura 5: Parâmetros hematológicos – série leucocitária dos animais submetidos a técnica cirúrgica experimental de transecção medular e acometidos com cistite neurogênica.....	43
Figura 6: Parâmetros hematológicos – série vermelha e plaquetas dos animais submetidos a técnica cirúrgica experimental de transecção medular e acometidos com cistite neurogênica. ....	44
Figura 7: Efeito do tratamento oral da fração acetato de etila da <i>B. orellana</i> , sobre os parâmetros urinários nos diferentes grupos experimentais.. ....	48
Figura 8: Sedimentoscopia das amostras de urina dos grupos experimentais. ....	52
Figura 9: Sedimentoscopia das amostras de urina dos grupos experimentais. ....	53
Figura 10: Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) dos grupos experimentais pertencentes ao estudo, realizada 24 horas após o 3º dia de tratamento experimental.....	54
Figura 11: Histologia das amostras de bexiga urinária dos respectivos grupos experimentais .....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Bixa orellana L. (Urucum)</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Bexiga Neurogênica associada ao trauma medular</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3 Infecção do Trato Urinário (ITU)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4 Tratamento de DNTUI e ITU's</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (BoEH) das folhas de B. orellana e separação das subfrações da fração acetato de etila (BoEA) ..</b>	<b>28</b>
4.1.1 Obtenção do extrato bruto e frações .....	28
4.1.2 Fracionamento em Coluna Cromatográfica .....	28
4.1.3 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD).....	29
4.1.4 Caracterização da fração pura por Espectrometria de Massas (ESI/MS) 29	
<b>4.2 Experimentação animal</b> .....	<b>29</b>
4.2.1 Animais.....	29
4.2.2 Técnica cirúrgica experimental .....	30
4.2.3 Avaliação de motricidade dos animais e diagnóstico da BN .....	32
<b>4.3 Isolamento, identificação e caracterização bioquímica de microrganismos isolados em bexiga neurogênica em modelo experimental</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da fração acetato de etila (BoEA) e subfrações – Ensaio in vitro</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana in vivo</b> .....	<b>34</b>
4.5.1 Urinálise .....	35
4.5.2 Análise microscópica de sedimento de urina .....	35
4.5.3 Avaliação de parâmetros laboratoriais .....	35
<b>4.6 Avaliação Histológica</b> .....	<b>36</b>

<b>4.7 Análise estatística .....</b>	<b>36</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Cromatografia em Coluna Clássica (CCC), da fase acetato de etila de <i>B. orellana</i> .....</b>	<b>37</b>
5.1.1 Perfil dos grupos de frações obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD).....	37
<b>5.2 Identificação dos microrganismos uropatogênicos no modelo experimental de BN e antibiograma .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da fração acetato de etila (BoEA) e do seu composto, o Ácido Elágico.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4 Avaliação das amostras biológicas coletadas em cistite induzida em modelo experimental de bexiga neurogênica (BN) .....</b>	<b>41</b>
<b>5.5 Histologia .....</b>	<b>54</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO A – ESCALA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN (BBB) .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais contêm em suas essências princípios ativos, os quais, ao serem analisados no combate às doenças, apontam potencial terapêutico (BADKE et al., 2011). A utilização destas plantas pode ter seu uso medicinal validado através de pesquisas científicas, implicando na formação de novos fármacos trazendo benefícios, como baixo custo e fácil acesso, redução de efeitos adversos e, prevenção ou diminuição dos riscos de intoxicação por uso inadequado. Neste contexto, várias pesquisas têm investigado as atividades biológicas dos compostos fitoquímicos de plantas, devido as suas extensas propriedades biológicas.

Nossa pesquisa utilizou o urucum (*Bixa orellana*), espécie vegetal nativa do Brasil, mas também está presente em outros países tropicais, como Peru, Colômbia, Equador, México, Indonésia Índia e África Oriental (ELIAS et al., 2002; L PRADA et al., 2016), como objeto deste estudo. Esta planta apresenta bastante atratividade biomédica por possuir utilização etnofarmacológica para tratamento de várias doenças infecciosas, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças cardíacas, gastrointestinais, diarreia, asma, febre, malária e quadros inflamatórios. Entretanto, o conhecimento científico sobre a bioatividade de seus compostos fitoquímicos ainda são escassos e incipientes.

Quanto a atividade antimicrobiana de *B. orellana*, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram resultados satisfatórios, onde o extrato hidroalcoólico (BoEH) e a fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *B. orellana*, testados contra *M. abscessus massiliense* em modelo experimental de peritonite animal, manifestaram respectivamente a CIM de 2,34 mg/mL e CBM de 37,5 mg/mL, e CIM 0,39 mg/mL e CBM de 6,25 mg/mL, indicando possível atividade bacteriostática (LIMA VIANA et al., 2018). Além disso, os estudos de Majolo, (2010), Pierpaoli et al. (2017), Raga et al. (2011) e Shilpi et al. (2006) comprovaram a ação do extrato de urucum contra bactérias como *E. feacalis*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias causadoras de disenteria, como *Shigella dysenteriae*. Segundo Pierpaoli et al., (2017) a suplementação com tocotrienóis de *B. orellana* aumentam a eficiência do tratamento com daptomicina em animais infectados com *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA). Compostos da família dos

sesquiterpenos derivados do extrato hidroalcoólico de folhas de urucum demonstraram atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (RAGA et al., 2011).

No que diz respeito aos compostos presentes na fração acetato de *B. orellana* podem ser destacadas a procianidina B-3, procianidina B-2 e isômero elagitanina (LIMA VIANA et al., 2018). Estes compostos, segundo Wang et al., (2015), Schmuck et al. (2015) e Voravuthikunchai et al. (2012) demonstraram atividade antibacteriana, contra *Staphylococcus aureus*, *Prophyromonas ainaivalis* e *E. coli* respectivamente, bactérias consideradas uropatogênicas.

Desta forma, baseado na importância do tratamento das infecções bacterianas que causam cistite neurogênica em pacientes com lesão medular traumática, torna-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas, tendo em vista que microrganismos podem desenvolver resistência à diversos medicamentos. É importante destacar que a bexiga neurogênica tem uma relevância clínica, física e de qualidade de vida significativa em pacientes com lesão medular (LM) (REDSHAW et al., 2018), podendo causar infecções recorrentes do trato urinário (DONOVAN, 2007). Aproximadamente 80% dos pacientes com LM relatam algum grau de disfunção da bexiga dentro de um ano de lesão (MANACK et al., 2011). Infecções do trato urinário (ITU) e uropatias obstrutivas são comuns em pacientes com bexiga neurogênica após lesão medular (NICOLLE, 2014).

Isto posto, propomos analisar nesta pesquisa, em caráter inédito, a atividade antimicrobiana dos compostos fitoquímicos do urucum (*B. orellana*), em modelo experimental de BN em ratos, assim como seu efeito sinérgico com antibióticos classificados como terapia de primeira escolha para o tratamento de cistite neurogênica. Considerando o benefício da prática terapêutica utilizando antimicrobianos originados a partir de plantas, além da notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas como tratamento alternativo e colaborar para o desenvolvimento científico nacional e da indústria farmacêutica brasileira.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Bixa orellana* L. (Urucum)

*Bixa orellana* L. é uma espécie vegetal nativa do Brasil, mas também está presente em outros países tropicais, como Peru, Colômbia, Equador, México, Indonésia Índia e África Oriental (ELIAS et al., 2002; VILAR et al., 2014; L PRADA et al., 2016). Tem o nome popular “Urucum” no Brasil (VILAR et al., 2014). É amplamente utilizada na medicina popular para tratar diferentes doenças.

Sua semente é frequentemente utilizada como laxante, tônico cardíaco, hipotensor, expectorante, antibiótico e às vezes aplicada como anti-inflamatório para o tratamento de doenças pulmonares, como bronquite, ou mesmo como colírio para vermelhidão (VILAR et al., 2014). Suas folhas são consumidas para o tratamento de mordida de cobra (OTERO et al., 2000), diarreia, gonorreia, (CACERES et al., 1995), hepatite (VILAR et al., 2014), gastrite (LENTZ et al., 1998), diurético, antipirético e para problemas de pele (VILAR et al., 2014).

Pierpaoli et al. (2017) demonstraram que a adição de tocotrienóis derivado de *B. orellana* aumenta a eficácia *in vitro* do tratamento com doptamicina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (PIERPAOLI et al., 2017). Rojas et al. (2006) mostraram atividade desta planta inibindo o crescimento de *Bacillus cereus* (ROJAS et al., 2006). Isso pode representar um avanço importante no tratamento de bactérias resistentes a antibióticos.

Vários estudos mostram a ação do extrato bruto de *B. orellana* contra diferentes bactérias, tanto as sementes (GALINDO-CUSPINERA et al., 2003; OYEDEJI et al., 2005; ROJAS et al., 2006; VILAR et al., 2014; PIERPAOLI et al., 2017) como as folhas (FLEISCHER et al., 2003), contra bactérias de diferentes gêneros. Entre as espécies de bactérias descritas na literatura estão: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) (FLEISCHER et al., 2003; GALINDO-CUSPINERA et al., 2003; PIERPAOLI et al., 2017); *Bacillus cereus* (GALINDO-CUSPINERA et al., 2003; ROJAS et al., 2006); *Escherichia coli* (FLEISCHER et al., 2003; ROJAS et al., 2006); *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*; *Lactococcus lactis*, *Paenibacillus polymyxa*; *Clostridium perfringens* (GALINDO-CUSPINERA et al., 2003); *Bacillus subtilis*; *Streptococcus pyogenes*; *Salmonella typhi*; *Pseudomonas aeruginosa*

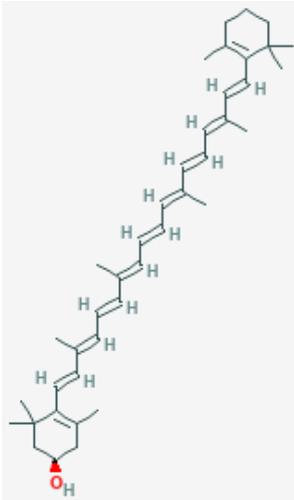
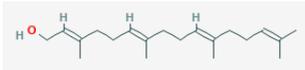
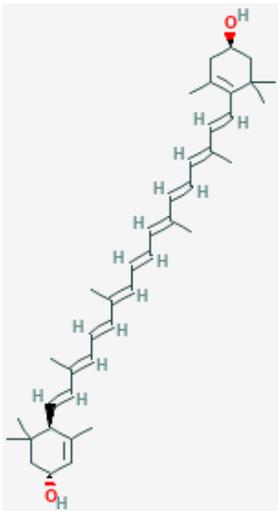
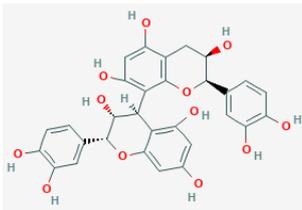
(FLEISCHER et al., 2003); *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (LIMA VIANA et al., 2018).

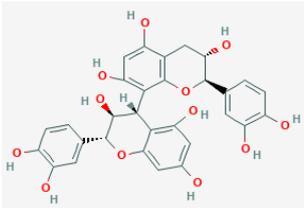
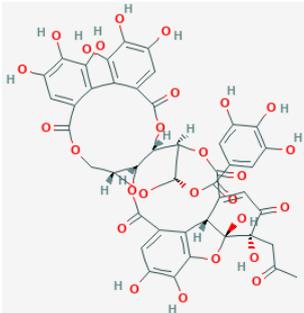
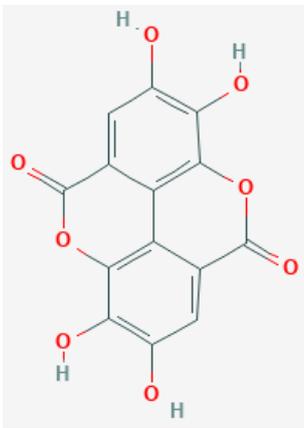
O extrato hidroalcoólico (BoHE) e a fração acetato de etila (BoEA) das folhas de *B. orellana* também apresentaram atividade contra algumas bactérias (FLEISCHER et al., 2003; LIMA VIANA et al., 2018). A ação do extrato de folhas contra a infecção por micobactérias de crescimento rápido, especificamente *Mycobacterium abscessus* Subsp. *massiliense*. A concentração inibitória mínima do extrato contra *M. abscessus* foi obtida resultando em 2,34 mg / mL para BoHE e 0,39 mg / mL para BoEA. Ao comparar a citotoxicidade também avaliada neste trabalho, foi obtido o resultado do Índice Seletivo de 19,8 para BoEA e 3,2 para BoHE. Isso mostra uma importante atividade antimicrobiana para esse grupo de bactérias (LIMA VIANA et al., 2018).

Outros estudos utilizando o extrato etanólico das folhas de *B. orellana* foram realizados com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana através da observação do crescimento das colônias. Estes trabalhos demonstraram boa atividade do extrato contra as bactérias: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (FLEISCHER et al., 2003).

Uma revisão sobre a atividade antimicrobiana dos extratos de sementes e folhas de *Bixa orellana* L. (Urucum) já descrita na literatura, é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de compostos fitoquímicos isolados de sementes e folhas do extrato de *Bixa orellana* L. (Urucum).

Parte da planta	Composto	Estrutura molecular	Atividade antimicrobiana
Sementes	Cryptoxanthin		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
	Geranylgeraniol		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Leishmania amazonensis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Lutein		<i>Listeria monocytogenes</i> ,  <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i>
Folhas	Procyanidin B2		<i>Porphyromonas gingivalis</i>  Influenza virus

	Procyanidin B3		<i>Staphylococcus aureus</i>
Folhas	Ellagitannin isomer		<i>Escherichia coli</i>
	Ellagic acid deoxyhexose		<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fonte: MORAES-NETO et al. (2020).

## 2.2 Bexiga Neurogênica associada ao trauma medular

O processo de micção demanda da coordenação entre o sistema nervoso central e o periférico. Portanto, requer o funcionamento adequado do complexo da bexiga e do esfíncter uretral. A interrupção dessa via causada por lesão ou doença interfere nesse esforço coordenado e pode provocar o desenvolvimento de bexiga neurogênica (BN) com armazenamento e esvaziamento anormais da bexiga (MCKIBBEN et al., 2015).

O termo "bexiga neurogênica" inclui toda a bexiga, esfíncteres uretrais e disfunções do assoalho pélvico causadas por uma grande variedade de patologias congênitas ou adquiridas do sistema nervoso central e periférico. Em termos de nomenclatura, o termo BN pode ser substituído por disfunção

neurogênica do trato urinário inferior (DNTUI), de acordo com a International Continence Society (ICS) e a European Urological Association (EUA), (BENEDETTO, 2017).

A disfunção neurogênica do trato urinário inferior é um grande problema médico e social, e pode ser causada por algumas doenças e/ou eventos que afetam o sistema nervoso que coordena o trato urinário inferior. O resultado da disfunção neurogênica do trato urinário depende da localização e extensão da lesão neurológica (LIAO, 2015). A disfunção da bexiga é uma causa secundária de uma lesão no sistema nervoso central e periférico como, lesões focais (acidente vascular cerebral, tumor, lesão traumática da medula espinhal, mielopatias devido a artrose cervical, espinha bífida), lesões disseminadas (doença de Parkinson, trauma cerebral, esclerose múltipla) e neuropatias periféricas (diabetes mellitus). Pacientes com BN têm maior risco de complicações a longo prazo. A BN pode levar a alterações urológicas incluindo infecções recorrentes do trato urinário e inevitavelmente levando à diminuição da qualidade de vida do paciente (AMARENCO et al., 2017).

As causas mais comuns para o desenvolvimento de BN são esclerose múltipla e lesão medular (LM). Os pacientes apresentam principalmente retenção urinária e incontinência por transbordamento (LI et al., 2016). De acordo com um banco de dados dos EUA, 29% e 36% desses pacientes apresentaram infecção recorrente do trato urinário (ITU), (MANACK et al., 2011).

A fisiopatologia da lesão neurológica e sua interação com a micção coordenada cria o pano de fundo para a disfunção do trato urinário inferior. A lesão interrompe a comunicação entre a bexiga e o cérebro, e a gravidade dessa interrupção se correlaciona diretamente com a forma como o trato urinário inferior pode executar um mecanismo coordenado de armazenamento e micção (NSEYO & SANTIAGO-LASTRA, 2017).

Uma lesão medular (LM) pode ser consequência de eventos traumáticos ou não traumáticos, levando à fratura ou luxação da coluna vertebral, resultando em danos à medula espinhal (HAMID et al., 2018). Pode resultar do impacto direto de um objeto em movimento rápido que atinge a coluna ou por força indireta causada por movimentos da coluna, que estão além do alcance

fisiológico. Essas lesões geralmente estão relacionadas à compressão, flexão, extensão ou rotação (VENKATESH et al., 2019).

A lesão medular paralisa aproximadamente 130.000 pessoas todos os anos, no mundo inteiro. Há perdas catastróficas das funções do sistema nervoso motor, sensorial e autônomo abaixo do nível do cordão lesionado, apresentando aos pacientes grandes desafios pessoais, sociais e econômicos (BOWES & YIP, 2014).

Independentemente da causa da lesão medular, a patologia resultante é causada por dois mecanismos, o dano mecânico inicial e secundária alteração devido a efeitos vasculares e bioquímicos. O impacto inicial leva a hemorragia imediata e morte celular rápida no local do impacto, seguida por várias cascatas de lesões secundárias que causam mais perda e disfunção tecidual (OYINBO, 2011).

A lesão medular é uma das patologias mais debilitantes, levando a enormes desafios de reabilitação (OYINBO, 2011). Pacientes com lesão medular podem desenvolver uma disfunção neurogênica do trato urinário inferior (VIGIL et al., 2016). O grau de dano neurológico depende do nível, gravidade e extensão da lesão e se a transecção é completa ou parcial. O manejo urológico desses pacientes envolve a proteção das áreas superiores, prevenção de complicações, facilitando a drenagem da bexiga e mantendo a qualidade de vida (BLOK et al., 2015).

Estudos são realizados, incluindo com modelos experimentais, para contribuir com o tratamento de lesões medulares. Os modelos animais de LM não humanos têm sido utilizados para desenvolver conhecimentos fisiopatológicos sobre lesão celular e processo de reparo da medula espinhal. Para escolher um modelo animal, alguns fatores são considerados, dependendo do objetivo proposto no estudo. Transecções e contusões da medula espinhal são os métodos mais comumente usados como modelo animal de LM (SHARIF-ALHOSEINI & RAHIMI-MOVAGHAR, 2014).

O manejo de pacientes com disfunção neurogênica do trato urinário inferior e com lesão medular é o modelo de referência em que se baseia a

abordagem dessa disfunção causada por outras doenças nervosas (BENEDETTO, 2017).

Exames clínicos completos, incluindo a urodinâmica e estudos de imagem radiográfica seletiva, são indispensáveis em todos os casos da bexiga neurogênica, pois esses resultados possibilitam a melhor escolha dos tratamentos para cada caso específico (DRAKE et al., 2016; STOFFEL, 2016). Uma investigação urodinâmica é o método que pode avaliar objetivamente a função e disfunção do trato urinário inferior. A qualidade do registro urodinâmico e sua interpretação devem ser garantidas (LIAO, 2015).

Técnicas urodinâmicas, incluindo urofluxometria e cistometria de enchimento, com ou sem triagem fluoroscópica síncrona adicional (videurodinâmica), são métodos úteis para examinar a função do trato urinário inferior, permitindo avaliações da relação pressão-volume durante o enchimento não fisiológico da bexiga e durante a micção (PHÉ et al., 2016). Os testes urodinâmicos realizados e todos os achados urodinâmicos devem ser relatados em detalhes, de acordo com as recomendações e padrões técnicos da International Continence Society (ICS), (SCHÄFER et al., 2002).

### **2.3 Infecção do Trato Urinário (ITU)**

Infecção do trato urinário (ITU) refere-se a uma resposta inflamatória do urotélio a microrganismos patogênicos no trato urinário (DUBBS & SOMMERKAMP, 2019). Esse termo “Infecção do Trato Urinário”, abrange bacteriúria assintomática (BAS), cistite aguda não complicada, cistite recorrente, BAS associado a um cateter, ITU associada a um cateter, prostatite e pielonefrite (GUPTA et al., 2017).

As ITUs sintomáticas geralmente estão associadas a piúria, a qual representa a presença de leucócitos na urina e indica uma resposta inflamatória ao processo infeccioso. O termo bacteriúria está relacionado à presença de bactérias na urina, tradicionalmente definida como pelo menos  $10^5$  UFC/mL na cultura (DUBBS & SOMMERKAMP, 2019). Vale a pena destacar que o trato urinário superior é estéril em circunstâncias normais. A bacteriúria geralmente ocorre por conta de bactérias ascendentes da flora vaginal/perineal (GLASER & SCHAEFFER, 2015; SCHAEFFER & NICOLLE, 2016).

Uma infecção do trato urinário inferior sintomática ou cistite, é diagnosticada com base na presença de sintomas como disúria, urgência, frequência, hematúria e desconforto suprapúbico em combinação com bacteriúria (GLASER & SCHAEFFER, 2015; SCHAEFFER & NICOLLE, 2016).

Ocorrem com maior frequência em mulheres, podendo ser não complicadas e tratadas com antibióticos orais. Ou podem progredir e evoluir para o trato urinário superior, levando a outras complicações. Quando ocorrem em homens e em populações especiais, o tratamento se torna mais complexo. A resistência a antibióticos também complica as estratégias de tratamento (DUBBS & SOMMERKAMP, 2019).

Uma população com risco de desenvolver ITU inclui pacientes com anormalidades miccionais relacionadas ao diabetes; bexiga neurogênica; lesão da medula espinal; gravidez; hipertrofia prostática; ou instrumentação do trato urinário, incluindo cateteres de longa duração ( $\geq 30$  dias), (SCHAEFFER & NICOLLE, 2016).

A disfunção no esvaziamento da bexiga contribui para infecções urinárias. A bexiga neurogênica provocada por lesão medular é um excelente exemplo de causa destas infecções (DUBBS & SOMMERKAMP, 2019). Infecção do trato urinário em pacientes com bexiga neurogênica é considerada complicada por possuírem fatores de risco que não existem em pacientes não neurogênicos (VIGIL & HICKLING, 2016). Avanços tecnológicos e uma melhor compreensão da fisiopatologia da bexiga neurogênica reduz a ocorrência de muitas complicações secundárias. Entretanto, a infecção do trato urinário é considerada uma das complicações mais difíceis de diagnosticar, tratar e prevenir em pacientes com bexiga neurogênica (VIGIL & HICKLING, 2016).

ITUs associadas a cateteres são a quarta infecção mais comum relacionada a serviços de saúde. O sistema de cateter urinário fornece um ambiente que promove o crescimento de biofilmes bacterianos. Algumas bactérias são especialmente favorecidas nesse ambiente, tais como *Pseudomonas* e *Proteus*, além de *E. coli* e *Enterococcus* (DUBBS & SOMMERKAMP, 2019).

Muitos pacientes com distúrbios neurológicos e urológicos, são tratados com cateterismo intermitente (CI) ou cateterismo intermitente limpo (CIL), (VIGIL & HICKLING, 2016). Pacientes cateterizados apresentam como sinais e sintomas sugestivos de ITU associada a um cateter um novo início ou agravamento da febre, rigidez, estado mental alterado, mal-estar ou letargia sem outra causa identificada, hematúria aguda ou desconforto pélvico. Já em pacientes dos quais os cateteres foram removidos nas últimas 48 horas, apresentam disúria, micção urgente ou frequente, dor ou sensibilidade suprapúbica, sugerindo um caso de ITU associada a um cateter (HOOTON et al., 2010). Existem outros mecanismos funcionais, imunológicos, celulares e inflamatórios menos conhecidos que contribuem para a predisposição à ITU (VASUDEVA & MADERSBACHER, 2014).

Parâmetros urodinâmicos anormais em pacientes com BN podem se correlacionar com o aumento do risco de ITU (MCKIBBEN et al., 2015). Cateteres urinários são uma estratégia de manejo essencial para pacientes com BN. No entanto, cateterismo intermitente limpo aumenta o risco de ITU causada pela contaminação do cateter e pela introdução de microrganismos externos no ambiente da bexiga (SCHLAGER et al., 1995).

#### **2.4 Tratamento de DNTUI e ITU's**

O cateterismo intermitente (CI) é geralmente recomendado como o método mais aconselhável de drenagem da bexiga em pacientes com LM. Os critérios a serem considerados na escolha de um método apropriado de drenagem da bexiga em pacientes com LM incluem: idade, sexo, comorbidades, nível da lesão, função dos membros superiores, assistência do cuidador, hábitos corporais, espasticidade e no mundo em desenvolvimento acesso a água corrente, saneamento e suprimentos de cateter (ROMO et al., 2018).

A oxibutinina é um medicamento anticolinérgico utilizado para aliviar dificuldades urinárias e da bexiga. É o fármaco de escolha para o tratamento de ITUs, principalmente quando existe a hiperatividade do detrusor neurogênico associado ao quadro. O tratamento cirúrgico inclui aumento da bexiga, esfínterectomia e desferenciação da bexiga por rizotomia da raiz dorsal sacral (LI et al., 2016).

Um estudo sugeriu que células progenitoras neurais transplantadas ou outras células-tronco podem promover a recuperação da função da bexiga através da regeneração do local da lesão (NEUHUBER et al., 2008). Na maioria desses estudos, as células-tronco foram injetadas diretamente na lesão, o que acarreta o risco de mais lesões na medula espinhal (LIAO, 2015).

O tratamento da ITU depende de fatores do hospedeiro (como sexo, sistema imunológico comprometido ou anormalidades urológicas), gravidade da doença e risco de resistência a múltiplas drogas (GUPTA et al., 2017).

A cistite, em mulheres que apresentam sintomas clássicos como disúria ou frequência urinária, sem sintomas sugerindo diagnósticos alternativos ou complicações subjacentes podem ser tratadas para ITU sem testes adicionais (GUPTA et al., 2017).

O tratamento de infecções do trato urinário é comprometido pela crescente prevalência de organismos resistentes e pelo potencial de propagação da resistência na flora normal do hospedeiro com o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro. Quatro agentes são recomendados para terapia de primeira linha: nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), pivmecillinam e fosfomicina trometamol (GUPTA et al., 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana da fração acetato de etila (BoEA) do extrato de folhas de *B. orellana* e seu composto isolado, o ácido elágico, contra microrganismos isolados em modelo experimental de bexiga neurogênica.

#### 3.2 Específicos

- Identificar e isolar compostos obtidos a partir da fração acetato de etila (BoEA) do extrato hidroalcoólico das folhas de *B. orellana*;
- Identificar microrganismos isolados em bexiga neurogênica induzida em modelo experimental;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) *in vitro* da fração acetato de etila (BoEA) do extrato hidroalcoólico das folhas de *B. orellana* e de seu composto isolado, o ácido elágico, sobre os microrganismos isolados em modelo experimental de bexiga neurogênica;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vivo*, da fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *B. orellana*, e do seu composto isolado, o ácido elágico, em modelo experimental de bexiga neurogênica;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (BoEH) das folhas de *B. orellana* e separação das subfrações da fração acetato de etila (BoEA)

#### 4.1.1 Obtenção do extrato bruto e frações

As folhas de *B. orellana* foram coletadas em 2019 entre os meses de abril e maio, no município de São José de Ribamar – MA, e sua identificação foi realizada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (Exsicata 1147). As folhas foram selecionadas, secas em estufa à 40°C por três dias consecutivos, e o material vegetal foi triturado em moinho de facas, extraído em etanol (70%) por maceração, sob agitação por 24h a temperatura ambiente. A amostra foi filtrada em funil, e o filtrado resultante foi concentrado à baixa pressão à 50°C, em rotaevaporador, até a evaporação total do solvente.

O concentrado resultante foi liofilizado e estocado a -20°C, e posteriormente 10g foram ressuspendidas em PBS para obtenção do extrato bruto (BoEH), e parte foi fracionada em solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, clorofórmio, acetato de etila. A partir do fracionamento foram obtidas as frações hexânica (BoHex), fração Clorofórmica (BoCl) e fração acetato de etila (BoEA).

#### 4.1.2 Fracionamento em Coluna Cromatográfica

A fase acetato (11,9988g) foi fracionada em uma coluna de vidro, preenchida com um adsorvente, sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm). O empacotamento da coluna foi realizado com hexano e acetato de etila e (8:2, v/v) e em seguida ocorreu a aplicação via seca da amostra no topo da coluna. Um gradiente de polaridade crescente de solventes foi usado como fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. No total foram obtidas 395 frações de 15 mL cada, que em seguidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (Thin layer chromatography – TLC), técnica de cromatografia usada para separar solvente, e agrupadas de acordo com a semelhança do perfil e em seguida analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE- DAD).

#### 4.1.3 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD)

O perfil de cada grupo de frações foi analisado por CLAE-PDA, modelo Shimadzu (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário, detector PDA (SPA-20A) com coluna Luna 5µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição A (Água e Ácido acético a 1%) e B (Metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 10% a 110 % de B em 60 min a um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os dados foram coletados e processados utilizando o software LC Solution.

#### 4.1.4 Caracterização da fração pura por Espectrometria de Massas (ESI/MS)

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em LCQ (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios ( $MS^2$ ,  $MS^3$  e  $MS^n$ ) foi realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo negativo e positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para os demais experimentos em múltiplos estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste ( $N_2$ ) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi  $m/z$  100-1000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA) foi usado para adquirir e processar os dados.

## 4.2 Experimentação animal

### 4.2.1 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados 24 ratos da espécie *Rattus norvegicus* (variedade albinus) da linhagem WISTAR, adultos com 60 dias de idade, machos, pesando 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade CEUMA. No período pré-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas individuais contendo água e ração, *ad libitum*, sob condições ambientais

padronizadas (ciclo 12h claro/escuro e temperatura entre  $23\pm 2$  °C), sendo os mesmos submetidos ao jejum hídrico e alimentar uma hora antes da cirurgia.

Todos os procedimentos experimentais nesta pesquisa obedeceram aos princípios técnicos e éticos de experimentação com animais de laboratório e foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos e procedimentos sobre experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade CEUMA, sob protocolo nº148/18.

#### 4.2.2 Técnica cirúrgica experimental

O protocolo anestésico consistiu-se na administração por via subcutânea (SC) de cloridrato de tramadol (5mg/kg), e após 30 minutos, administrou-se por via intraperitoneal (IP) a associação de acepromazina (1mg/kg), cloridrato de quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (9mg/kg). Após a perda dos reflexos motores e do reflexo de retirada da pata, os animais foram posicionados em decúbito ventral, com os membros torácicos e pélvicos estendidos.

Em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia da região da coluna torácica e lombar, com assepsia desta região com solução de clorexidina a 2% e álcool iodado (figura 1A). Após este procedimento, foi realizada uma incisão mediana dorsalmente à coluna vertebral com posterior afastamento do tecido muscular epaxial com auxílio de um afastador Alm Agudo 10 cm – Montserrate e, sequencialmente, iniciou-se a laminectomia com auxílio de um microalveolótomo.

A laminectomia foi realizada entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> vértebra torácica (T12-T13), (figura 1B) onde foi realizada a transecção completa da medula espinhal exposta (figura 1C). Após isso, foi realizada a sutura, com fechamento por planos (camada muscular e da pele), de acordo com o protocolo cirúrgico proposto por Silva et al. (2007).

O protocolo de analgesia pós cirúrgico foi constituído pela administração de cloridrato de tramadol na dose de 5mg/kg por via intramuscular (IM), BID, durante três dias após a realização do procedimento, duas vezes ao dia.

É importante destacar que ao final de cada cirurgia, os animais foram mantidos em uma câmara de aquecimento com luz infravermelha, com oferta adicional de O<sub>2</sub> para manutenção de uma oximetria entre 95 - 98% (figura 1D). Além disso, foram monitorados os parâmetros como: frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura e oximetria, até a recuperação anestésica, com posterior oferta de soro glicosado (via oral) no início do período de recuperação anestésica.

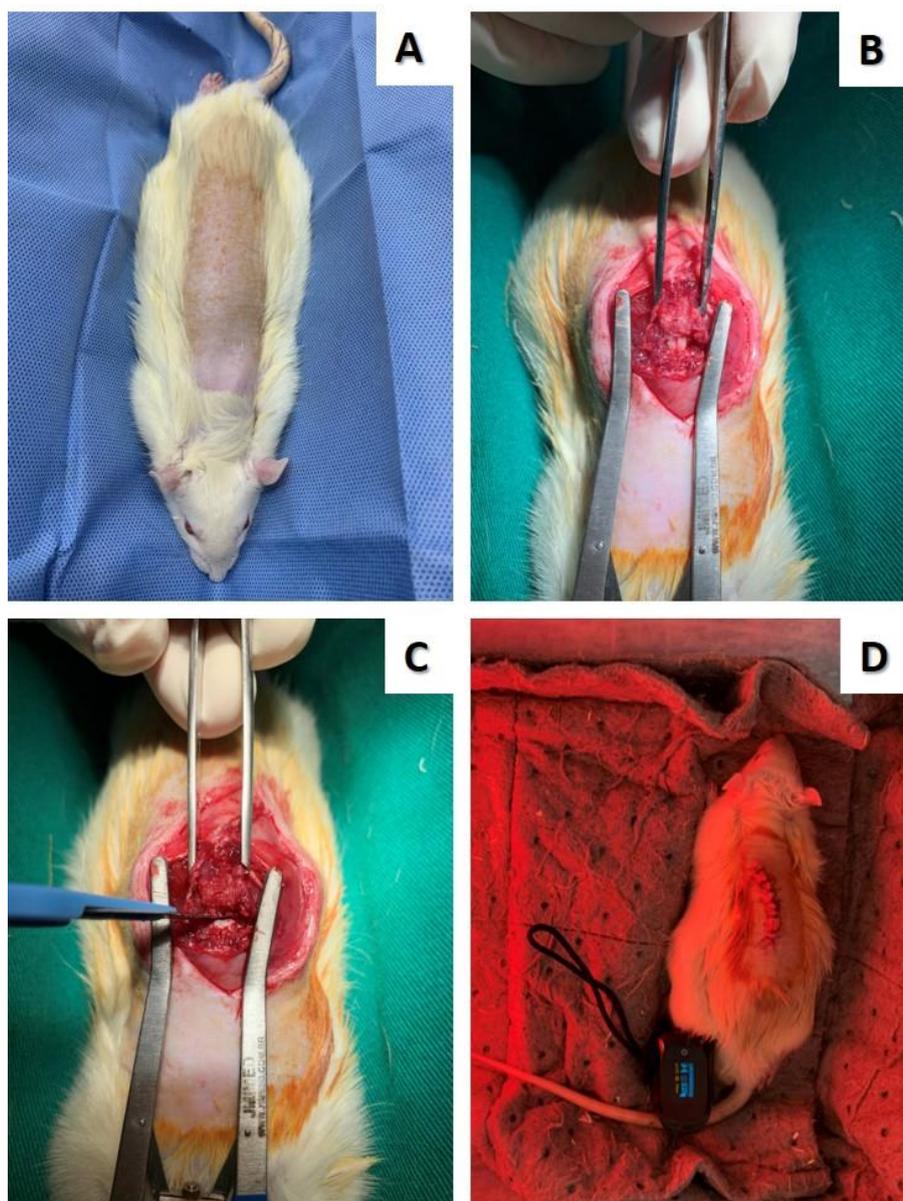


Figura 1: Laminectomia – técnica cirúrgica de transecção medular completa e recuperação anestésica. A) Animal em decúbito ventral após tricotomia dorsal e indução da anestesia. B) Laminectomia – T12-T13, com posterior exposição da medula espinhal. C) Transecção completa da medula espinhal. D) Recuperação do animal após a cirurgia em câmara de aquecimento e monitoramento dos parâmetros.

#### 4.2.3 Avaliação de motricidade dos animais e diagnóstico da BN

Após 24 horas do procedimento cirúrgico, foram realizadas avaliações motoras seguindo o protocolo proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), que corresponde a um escore entre 0-21, sendo utilizada para avaliar a motricidade dos animais com lesão medular (figura 2), (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). Os animais ficaram em um local padronizado, com fundo escuro, de dimensões de 90 cm de diâmetro e 7 cm de altura sem presença de ruídos.

O diagnóstico clínico da BN foi realizado inicialmente por uma avaliação clínica e comportamental, destacando a presença da condição de retenção urinária, perda do controle da micção e musculatura lisa vesical, ocorrido em decorrência da lesão medular. Posteriormente, os parâmetros laboratoriais como exames de urina e a associação de elementos clínicos como disúria, hematúria e bacteriúria foram realizados.

Foram selecionados e incluídos para etapa experimental de tratamento, os animais que obtiveram score entre 0-1 na escala de BBB (ANEXO A), e com o diagnóstico clínico de BN. Foram excluídos do estudo os animais que obtiveram score >2 na escala BBB, e sem diagnóstico clínico da BN.

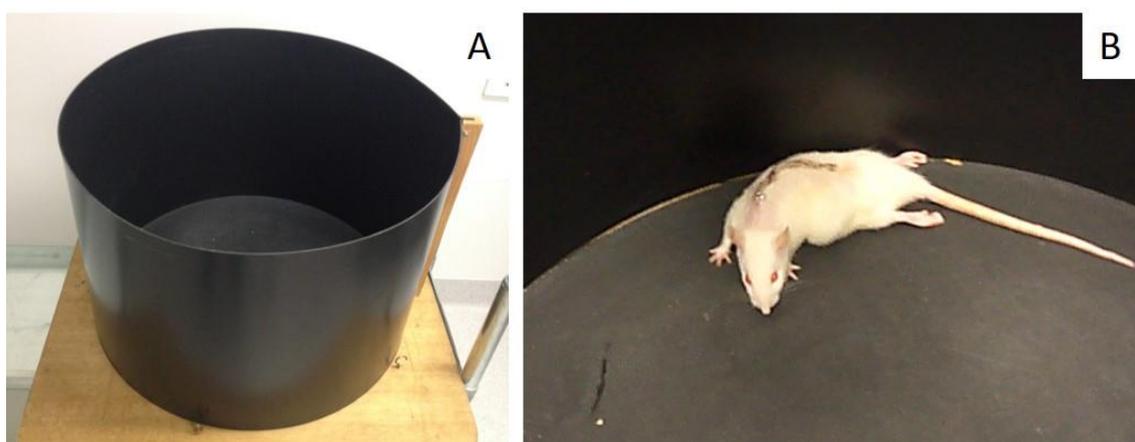


Figura 2: Teste de motricidade de BBB - Basso, Beattie e Bresnahan. A – Caixa utilizada para observação e avaliação dos animais, em ambiente controlado quanto a luminosidade e ruídos. B - Avaliação da deambulação do animal, 24 horas após a cirurgia experimental, onde observa-se o score 0 na escala de BBB - nenhum movimento observável dos membros pélvicos.

### **4.3 Isolamento, identificação e caracterização bioquímica de microrganismos isolados em bexiga neurogênica em modelo experimental**

Após o procedimento cirúrgico experimental, e da seleção dos animais pela avaliação da escala BBB e aspectos clínicos acima referendados, os animais foram contidos fisicamente, com posterior antisepsia da região pélvica, com álcool 70%, e submetidos ao procedimento mecânico de massagem vesical para esvaziamento da bexiga e coleta da urina, objetivando o isolamento dos microrganismos causadores da bexiga neurogênica. O volume das amostras de urina manteve um padrão médio de 2,5mL por coleta, destacando que, como manejo pós-operatório e visando o bem-estar dos animais, esse procedimento de esvaziamento da bexiga foi realizado duas vezes ao dia.

A amostra biológica foi armazenada em falcons estéreis de 15mL e mantidas sob refrigeração (4-8°C), para a realização dos testes físico-químicos, sedimentoscopia, urocultura e contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC). Após coleta, as amostras de urina foram diluídas em solução salina (diluições seriadas em salina 0,9% estéril de 10, 100, 1000 e 10000 vezes). Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi plaqueada em CLED e Ágar MacConkey (MC), e as placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação as UFC foram contadas.

A identificação das bactérias e o teste de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados utilizando o sistema automático VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'étoile, France), de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da fração acetato de etila (BoEA) e subfrações – Ensaio *in vitro***

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços. Para isso, a suspensão microbiana foi reativada e ajustada a concentração 0,5 da escala de MacFarland, fazendo a diluição de 1:10. Após a preparação do inóculo bacteriano, este foi transferido para uma placa de 96 poços distribuindo da seguinte forma: A fileira 11 com o Controle Negativo (meio + inóculo); a fileira 12 foi utilizada como Controle Positivo (meio + antibiótico + inóculo), como controle de pureza do meio (meio puro) e controle

de crescimento (meio + inóculo); as fileiras 1 a 10, realizadas diluições seriadas dos compostos, além da adição de meio e do inóculo bacteriano. Os ensaios foram realizados em duplicatas. Após a preparação do ensaio, a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A revelação da placa foi feita pela adição de 30 µL de Resazurina 0,03% por poço e incubada novamente por 30 minutos. A CIM (em mg/mL) foi dita como a menor concentração da subfração, onde não houve alteração da coloração.

Para determinar o CBM utilizou-se a placa do teste de CIM. Uma alíquota de 10µL de cada poço foi incubada em placas contendo meio Mueller Hinton e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C por 18-24h. A CBM foi dita como a menor concentração da subfração, onde não foi observado crescimento celular significativo sobre a superfície do ágar inoculado (90% de morte microbiana).

#### **4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo***

Para esta etapa experimental, os animais foram divididos em 8 grupos, a saber: a) **Controle Negativo (CN)** n = 3 – animais saudáveis, sem intervenção cirúrgica e sem tratamento; b) **SHAM** n = 3 – (cirurgia placebo) intervenção cirúrgica falsa, sem realização da etapa terapêutica, para isolamento os efeitos dos tratamentos considerados acessórios, como os da anestesia, o trauma da incisão, cuidados pré e pós-operatórios; c) **SALINA** n = 3 – animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com solução salina (0,9%NaCl) + 2% Tween 20; d) **BoEA 50mg/kg** n = 3 – animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com 50mg/kg da BoEA; e) **BoEA 100mg/kg** n = 3 - animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com 100mg/kg da BoEA; f) **ANTB** n = 3 – animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com antibiótico – amoxicilina com clavulanato (50mg/kg); g) **Ác.E** n = 3 – animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com 25mg/kg do ácido elágico; h) **Ác.E + ANTB** n = 3 – animais submetidos a laminectomia e transecção medular, tratados com a associação de 12,5mg/kg de ácido elágico e 25mg/kg de antibiótico.

Os respectivos tratamentos foram iniciados depois do diagnóstico clínico de bexiga neurogênica, 24 horas após o procedimento cirúrgico experimental. O

mesmo foi realizado por gavagem, duas vezes ao dia (12 em 12 horas), durante 3 dias. O procedimento de eutanásia seguido da colheita das amostras biológicas foi realizado 24 horas após o último tratamento, mediante overdose anestésica da associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina (300 mg/kg e 30mg/kg, respectivamente), por via intraperitoneal.

Destaca-se que a dose de 50mg/kg da fração acetato de etila foi preparada com 300mg da BoEA diluída em 15mL de salina com 2% de tween 20, levando em consideração o peso médio dos animais de 300g.

#### 4.5.1 Urinálise

A amostra de urina, para realização da urinálise e sedimentoscopia foi coletada pela técnica de massagem vesical em dois momentos: o primeiro, 24 horas após a realização da cirurgia e diagnóstico da BN; o segundo, 24 horas após o término dos tratamentos.

Foi realizada a avaliação qualitativa de nitritos, proteínas, urobilinogênio, densidade da urina, cetonas, leucócitos, glicose, bilirrubina, hemácias, através de fita reagente para urina (*dipstick*). Os resultados do teste foram qualitativos e não quantitativos, isto é, a fita identificou a presença dessas substâncias citadas acima, com quantificação aproximada.

#### 4.5.2 Análise microscópica de sedimento de urina

As amostras de urina foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspenso. Uma gota foi colocada sobre a lâmina para análise ao microscópio e contagem de células. Foram analisados qualitativamente (tipos de células, cilindros, cristais, organismos) e quantitativamente (número de hemácias e leucócitos por campo). Pelo menos de 10 até 20 campos microscópicos foram observados e uma média foi realizada.

#### 4.5.3 Avaliação de parâmetros laboratoriais

A coleta do sangue terminal foi assim realizada: os animais foram anestesiados com dose de 200mg/kg de cloridrato de quetamina e 20 mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intraperitoneal. Após verificação de plano

anestésico, uma incisão na linha mediana ventral foi realizada, com acesso a cavidade abdominal, e dissecação da aorta abdominal e veia cava caudal. Em seguida, a veia cava caudal foi dissecada, onde realizou-se a venopunção, com retirada de 3-4 mL de sangue. Pelo mesmo acesso, após coleta sanguínea, foi administrado 100mg/kg e 10mg/kg de cloridrato de ketamina e xilazina respectivamente, para procedimento de eutanásia. As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletadas com EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico (Contador de sangue animal Vet abcTIM). Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas.

#### **4.6 Avaliação Histológica**

Após o período experimental e eutanásia dos animais, foram coletados fragmentos das bexigas, os quais foram submetidas a técnica de análise histológica, que consistiram ao processo de desidratação por uma série crescente de álcoois (70-100%), diafanização por xilol e parafinização overnight. Em seguida o material foi cortado em micrótomo manual (5 $\mu$ m), com posterior desparafinização em estufa (60°C) e coloração em Hematoxilina-Eosina. As lâminas então foram fotodocumentadas para comprovação dos achados científicos.

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos através de média  $\pm$  desvio padrão (Média  $\pm$  DP). A distribuição de normalidade foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de Turkey, usando software GraphPad Prism 6.0. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cromatografia em Coluna Clássica (CCC), da fase acetato de etila de *B. orellana*

#### 5.1.1 Perfil dos grupos de frações obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD)

Foram obtidos por cromatografia em coluna clássica, usando sílica como fase estacionária um total de 10 grupos de frações (G1- G10) de diferentes composições. O rendimento de cada grupo está descrito na tabela 2.

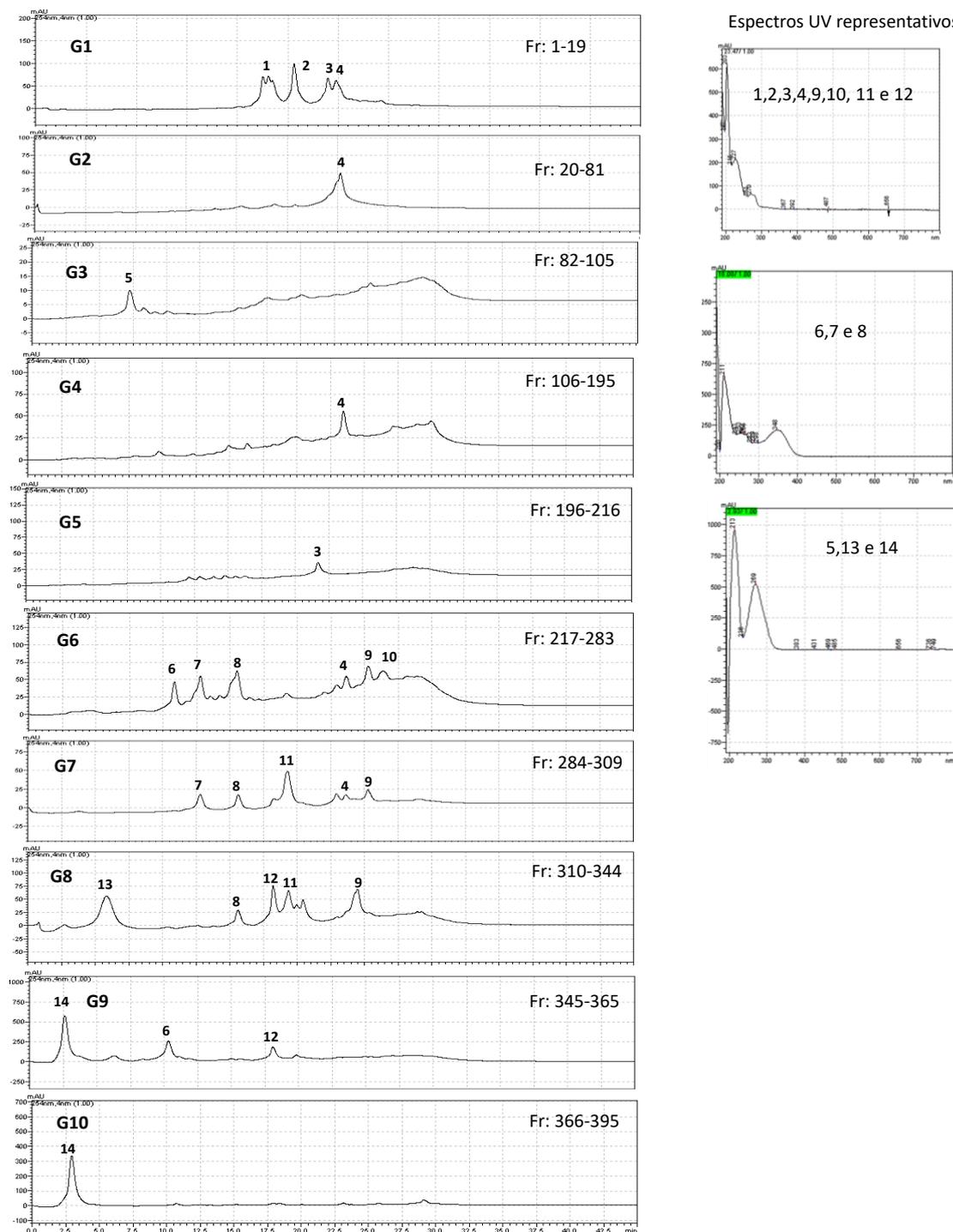
Tabela 2. Rendimento dos grupos de frações (G1- G10) da fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *B. orellana*.

N°	TUBOS	SEM	COM	AMOSTRA
		AMOSTRA (G)	AMOSTRA (G)	(G)
<b>G1</b>	<b>1 - 19</b>	21,5334	21,9555	0,4123
<b>G2</b>	<b>20 - 81</b>	16,6159	17,0732	0,4573
<b>G3</b>	<b>82 - 105</b>	21,1399	21,2446	0,1047
<b>G4</b>	<b>106 - 195</b>	17,7687	18,0159	0,2472
<b>G5</b>	<b>196 - 216</b>	21,3955	21,4125	0,0170
<b>G6</b>	<b>217 - 283</b>	16,3474	16,5236	0,1762
<b>G7</b>	<b>284 - 309</b>	17,5332	17,6433	0,1081
<b>G8</b>	<b>310 - 344</b>	16,7662	16,8520	0,0858
<b>G9</b>	<b>345 - 366</b>	20,8072	21,1571	0,3499
<b>G10</b>	<b>369 - 394</b>	32,0174	32,1515	0,1341

G = grupos de frações; g = grama

Os resultados do perfil de cada grupo de frações, bem como os espectros representativos para cada pico, obtido na região do UV, estão representados na figura 3. De acordo com a avaliação por CLAE-DAD para os grupos de frações, notou-se uma gama de diversos e complexos compostos na composição química da matriz, confirmada pelo grande número de picos em diferentes tempos de retenção, que foram eluídos durante a corrida cromatográfica. Com o auxílio do detector de arranjos de diodos (DAD), acoplado ao sistema HPLC, os dados cromatográficos foram obtidos em comprimentos de ondas seletivos para

classes de metabólitos secundários, sendo a classe sugerida dos flavonoides e ácidos fenólicos. As análises dos grupos de frações, a partir das análises por HPLC, revelaram que os flavonoides foram a classe majoritária dentre os outros



metabólitos constituintes.

Figura 3: Cromatogramas obtidos no método exploratório para cada grupo de frações, bem como os espectros representativos para cada pico, obtidos na região do UV.

Após análise da figura 3, é possível indicar que apenas o G10 apresenta-se com um único componente no perfil cromatográfico. Por isso foi realizada a caracterização química dessa substância por experimentos de infusão direta (FIA-ESI-MS), como demonstrado na tabela 3 e apresentado na figura 4.

Tabela 3. Caracterização química do grupo 10 (G10), substância identificada como ácido elágico.

[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>n</sup> ions	Identificação
301	257 [M-44-H] <sup>-</sup>	Ácido elágico (elagitanino)
	229 [M-44-28-H] <sup>-</sup>	

M= massa; H= hidrogênio; MS= espectrofotometria de massa; m/z = razão massa-carga

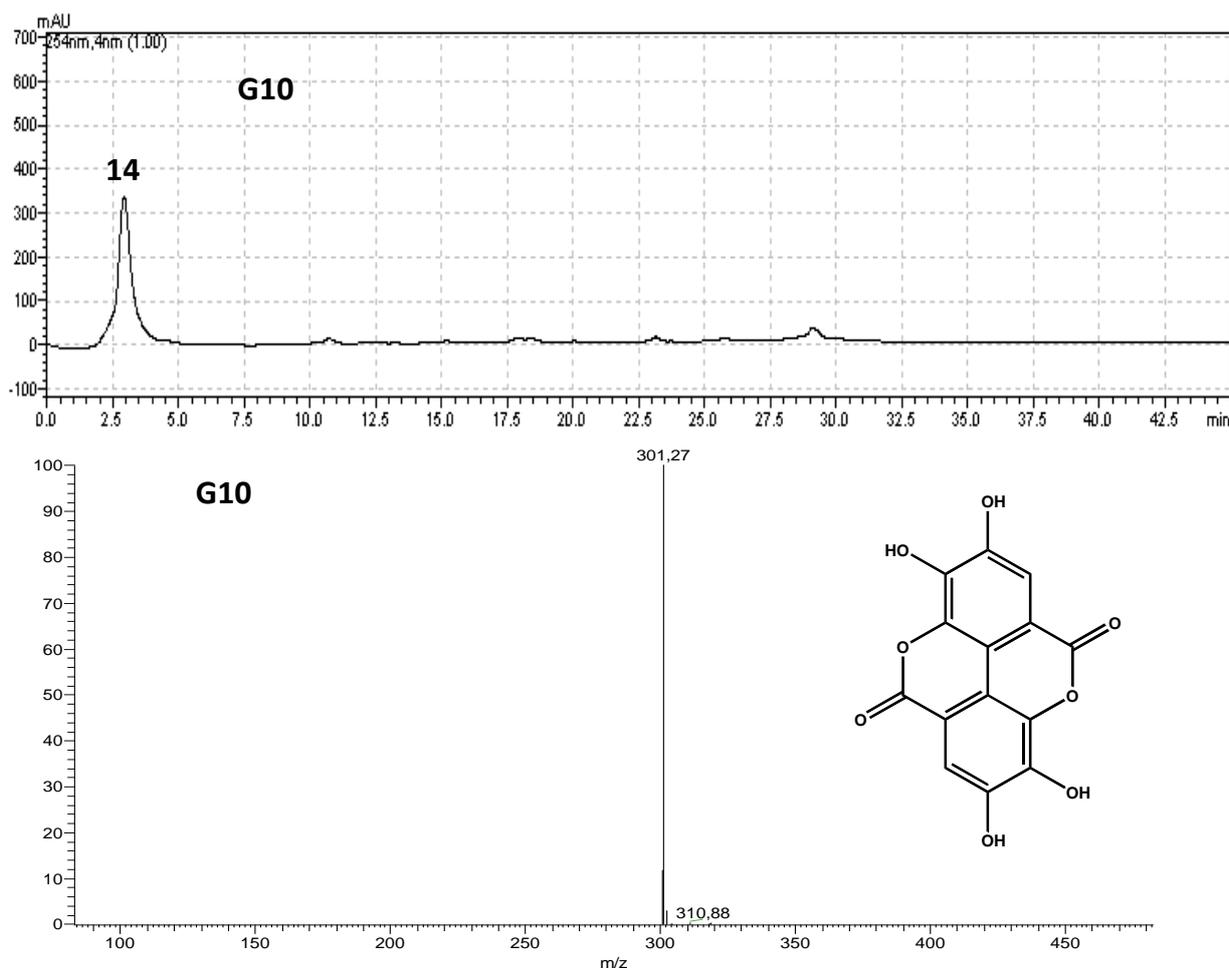


Figura 4: Perfil cromatográfico, espectro de fragmentação (ESI) para ácido elágico e estrutura do composto da fração pura (G10). Observou-se para o ácido elágico, m/z 301 ([M-H]<sup>-</sup>), os fragmentos m/z 257 e m/z 229, estando de acordo com o padrão de fragmentação para o mesmo.

## 5.2 Identificação dos microrganismos uropatogênicos no modelo experimental de BN e antibiograma

O espécime isolado foi identificado como *E. coli*, demonstrando sensibilidade a: ciprofloxacino; levofloxacino; cefazolina; ceftriaxona; imipenem; cotrimoxazol; cefepima; aztreonam; piperacilina; ampicilina; gentamicina; ceftazidima; meropenem; ácido nalidíxico; nitrofurantoína; amoxicilina/clavulanato.

## 5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da fração acetato de etila (BoEA) e do seu composto, o Ácido Elágico

A tabela 4 apresenta os resultados de Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas das subfrações presentes na fração acetato de etila (BoEA). Foi demonstrado os valores de 6,25 mg/mL para a CIM e CBM da BoEA contra *E. coli*. O ácido elágico (G10) apresentou os valores 25mg/mL para CIM e CBM respectivamente contra *E. coli* isolada.

Tabela 4. Determinação das concentrações inibitórias e bactericida mínimas da fração acetato de etila (BoEA) e grupos de frações contra *E. coli* isolada.

Subfrações	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<b>G1</b>	-	-
<b>G2</b>	25	-
<b>G3</b>	25	-
<b>G4</b>	-	-
<b>G5</b>	-	-
<b>G6</b>	25	-
<b>G7</b>	-	-
<b>G8</b>	-	-
<b>G9</b>	-	-
<b>G10</b>	25	25
<b>BOEA</b>	6,25	6,25

CIM = concentração inibitória mínima; CBM = concentração bactericida mínima; - = não foi possível determinar com as concentrações testadas; G = grupos de frações.

#### **5.4 Avaliação das amostras biológicas coletadas em cistite induzida em modelo experimental de bexiga neurogênica (BN)**

Os valores obtidos pelo hemograma e urinálise dos animais com BN foram comparados com os valores dos animais hígidos, além da análise entre os grupos tratados.

Os resultados do hemograma demonstram que a contagem diferencial de leucócitos: neutrófilos segmentados e linfócitos foi estatisticamente significativa entre os grupos estudados. O grupo BoEA (50mg/kg) demonstrou melhoria destes parâmetros quando comparado ao grupo Controle Negativo, entretanto, não se mostrou mais eficaz que o grupo Antibiótico (ANTB), tratados com amoxicilina com clavulanato (50mg/kg). Ainda nesta análise, o grupo associação (ácido elágico com antibiótico) apresentou significância estatística em relação ao grupo salina, o que pode demonstrar a eficácia dos tratamentos propostos, sendo a associação, para este parâmetro, o mais eficaz.

Quando a análise é em relação a contagem global dos leucócitos, é importante destacar que todos os grupos indicam valores inferiores de linfócitos com relação ao grupo Controle Negativo, ou seja, os animais hígidos. A contagem de monócitos não demonstrou valores estatisticamente significantes entre os grupos tratados em comparação ao grupo CN, apesar podermos evidenciar uma tendência ao aumento desse parâmetro nos grupos ácido elágico, associação e BoEA 50 mg/kg (Tabela 5 e Figura 5).

É importante destacar que, quando analisada a contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM e plaquetas não foram observadas diferenças significativas para estes parâmetros entre os grupos estudados (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos analisados do grupo controle negativo (CN) e grupos de animais tratados durante três dias. Os resultados estão expressos como média±e.p.m. \* p< 0,05 vs Controle Positivo; #p<0,05 vs Controle Negativo; a p< 0,05 vs ANTB; b p<0,05 vs Salina; c p<0,05 vs Antibiótico. (ANOVA, Tukey) (n=3).

PARÂMETROS	GRUPOS							
	CN	SHAM	SALINA	ANTIBIÓTICO	BoEA 50 mg/kg	BoEA 100 mg/kg	AcEI	ASSOC
Hemácias	6.95 ± 0,22	6.94 ± 0,33	6.93 ± 0,22	6.53 ± 0,20	6.62 ± 0,40	6.61 ± 1.12	7.63 ± 0.30	6.43 ± 0.55
Hemoglobina	13.00 ± 0,35	12.10 ± 0,40	12.50 ± 0,20	11.80 ± 0,12	11.83 ± 0,50	12.33 ± 1.52	13.93 ± 0.49	12.46 ± 1.11
Hematócrito	38.92 ± 0,52	37.50 ± 1,30	38.20 ± 0,70	36.40 ± 0,30	36.60 ± 1,50	35.96 ± 4.71	42.8 ± 1.45	35.97 ± 2.68
VCM	54.55 ± 1,42	54.10 ± 0,70	54.83 ± 1,10	55.70 ± 116	55.43 ± 2.00	55.4 ± 0.61	55.76 ± 0.33	55.83 ± 0.49
HCM	20.60 ± 0,51	20.43 ± 0,70	22.03 ± 0,90	21.90 ± 0,72	21.17 ± 0,73	19.09 ± 0.97	18.56 ± 0.23	19.35 ± 0.51
CHCM	33.44 ± 0,40	32.40 ± 0,05	52.67 ± 0,23	32.33 ± 0,10	32.40 ± 0,03	34.36 ± 1.35	33.33 ± 0.33	34.6 ± 0.77
Leucócitos Totais	4175 ± 352,1	4533.0 ± 318.0	3600 ± 500.0	3367 ± 371	3500 ± 400.0	3766.66 ± 2212.59	3400 ± 244.94	2900 ± 787.40
Neutrófilos Segmentados	826.3 ± 73,3	1998 ± 182,8#	1954 ± 342,0##	1211 ± 244.9	1421 ± 265.4	1615.66 ± 830.31	1118.66 ± 8.37	786 ± 304.88 <sup>b</sup>
Eosinófilos	72.25 ± 46,25	92.7 ± 31,81	28.33 ± 8,2	20.0 ± 10.0	13,0 ± 13	22 ± 31.11	0 ± 0	29 ± 7.87
Linfócitos	3288 ± 124,2	2333 ± 109,3#,*	1277 ± 227,5###	2040 ± 210.0##	1747 ± 320.5##	2042 ± 1392.55	2212.66 ± 242.66	2027 ± 602.65
Monócitos	71,8 ± 15,3	85.0 ± 2,88	123.5 ± 0,5	140.7 ± 16.7	67.0 ± 2.52 <sup>a</sup>	118.5 ± 13.5	71 ± 3	51 ± 15 <sup>c</sup>
Plaquetas	801767 ± 376,28	694533 ± 15358	725067 ± 20131	789833 ± 90562	747733 ± 69102	620333.33 ± 556199.2	688766,7 ± 35126.09	368000 ± 209757

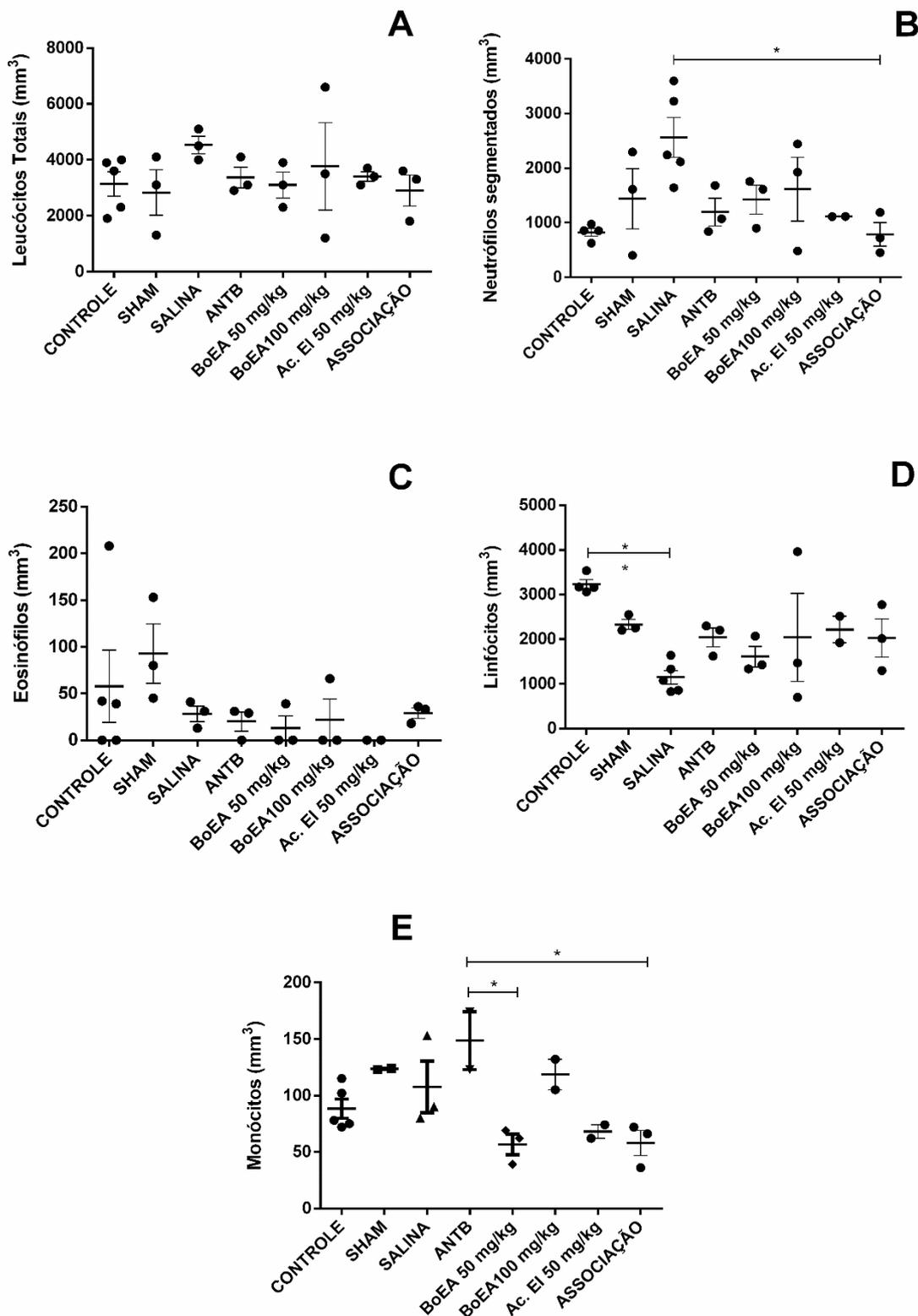


Figura 5: Parâmetros hematológicos - série leucocitária dos animais submetidos a técnica cirúrgica experimental de transecção medular e acometidos com cistite neurogênica. Em A - Leucócitos totais; B - Neutrófilos; C - Eosinófilos; D - Linfócitos e E - Monócitos. Controle - Animais saudáveis; ANTB - Antibiótico - animais tratados com amoxicilina com clavulanato na dose de 50 mg/kg. AC. El. - Ácido Eláxico. Associação - animais tratados com a associação do ácido eláxico com a amoxicilina com clavulanato (25 mg/kg e 25 mg/ kg). \* p value < 0.05.

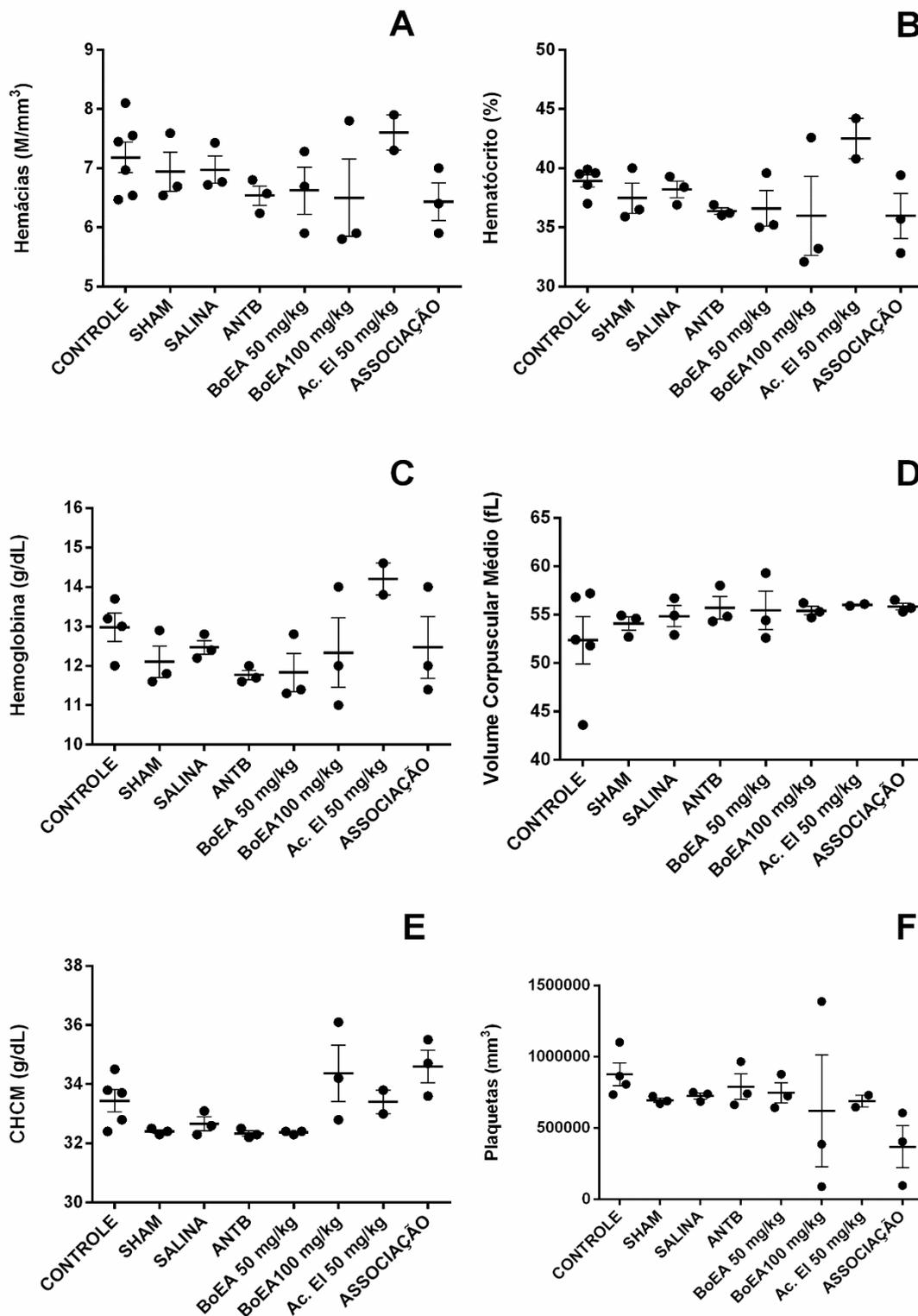


Figura 6: Parâmetros hematológicos – série vermelha e plaquetas dos animais submetidos a técnica cirúrgica experimental de transecção medular e acometidos com cistite neurogênica. Em A – Hemácias; B – Hematócrito; C – Hemoglobina; D – Volume corpuscular médio; E - CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média e F – Plaquetas. Controle – Animais saudáveis; ANTB – Antibiótico – animais tratados com amoxicilina com clavulanato na dose de 50 mg/kg. AC. El. – Ácido Elágico. Associação - animais tratados com a associação do ácido elágico com a amoxicilina com clavulanato (25 mg/kg e 25 mg/kg).

Quanto a urinálise, a análise semiquantitativa das amostras está exposta na tabela 6. Nos resultados observamos a distinção da coloração da urina entre os grupos controles, no qual o grupo dos animais operados e mantidos apenas com salina, apresentou hematúria, e o grupo controle negativo (CN), ácido elágico, associação e antibiótico demonstraram a urina incolor. Os grupos CN e SHAM, mostraram semelhança nos resultados dos parâmetros aspecto e coloração da urina. Os grupos tratados com 50 mg/kg do antibiótico (ANTB) e doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg da fração acetato de etila (BoEA) apresentam urina de coloração amarela e com aspecto límpido e turvo, respectivamente. Os grupos tratados com ácido elágico (25 m/kg), e com a associação do ácido elágico com o antibiótico (12,5 mg/kg do ácido elágico com 25 mg/kg do antibiótico, 25 mg/kg de amoxicilina com clavulanato) tiveram a urina de aspecto límpida e amarela.

Tabela 6. Teste urinário com fita reativa – análise física e química realizada nos diferentes grupos experimentais de acordo com os períodos experimentais proposto.

PARÂMETRO	CN	SHAM	SALINA	ANTB 50mg/kg	BoEA 50mg/kg	BoEA 100mg/kg	ÁcEI 25mg/kg	ÁcEI (12,5mg/kg) + ANTB(25mg/kg)
<b>Cor</b>	Incolor	Incolor	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
<b>Aspecto</b>	Límpido	Límpido	Turvo	Límpido	Turvo	Turvo	Límpido	Límpido
<b>Densidade</b>	1030	1030	1020	1030	1020	1025	1020	1025
<b>pH</b>	6	6	8	5	6,5	6	6	6
<b>Bilirrubina</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cetonas</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glicose</b>	1000	250	-	-	-	-	-	-
<b>Nitrito</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Proteína</b>	Traço	30	1000	Traço	Traço	-	-	-
<b>Leucócito</b>	-	70	125	Traço	-	-	-	-
<b>Sangue</b>	80	80	200	200	-	-	-	-
<b>Urobinogênio</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

CN – Controle Negativo; SHAM – Grupo falso operado; Salina – Grupo tratado com salina; ANTB – Grupo tratado com 50mg/kg do Antibiótico; BoEA 50mg/kg – Grupo tratado com 50mg/kg da Fração Acetato de Etila; BoEA 100mg/kg – Grupo tratado com 100mg/kg da Fração Acetato de Etila; Ác.E – Grupo tratado com 25mg/kg do ácido elágico; Ác.E + ANTB – Grupo tratado com associação de 12,5 mg/kg do ácido elágico e 25mg/kg do antibiótico; Traço = presença discreta; - = negativo.

Ainda na tabela 6, nesta análise pode-se observar que os resultados foram semelhantes entre todos os grupos nos seguintes parâmetros: nitrito, cetona, urobilinogênio e bilirrubina. Entretanto, quando analisado o pH, podemos observar que o grupo BoEA (100mg/kg) apresentou valores semelhantes aos grupos CN, Sham, ácido elágico e associação. Nesta mesma análise podemos notar um aumento estatisticamente significativo destes valores para o grupo CP e uma redução estatisticamente significativa para o grupo ANTB, quando comparados ao grupo CN. Em relação a presença de sangue na urina (hematúria), observamos que o grupo BoEA 50mg/kg apresentou uma redução estatisticamente significativa destes valores quando comparado aos grupos CP e ANTB (figura 7).

Observa-se que a densidade da urina não mostra uma diferença estatística significativa em nenhum dos grupos experimentais, portanto o modelo experimental e tratamento não causaram alterações nesse parâmetro de avaliação. Entretanto, quando a análise é realizada entre os grupos submetidos a lamnectomia, o grupo controle positivo (CP), após 3 dias, apresentou proteinúria, indicando possivelmente glomerulonefrite. As análises da densidade e proteinúria, são demonstradas na figura abaixo (figura 7):

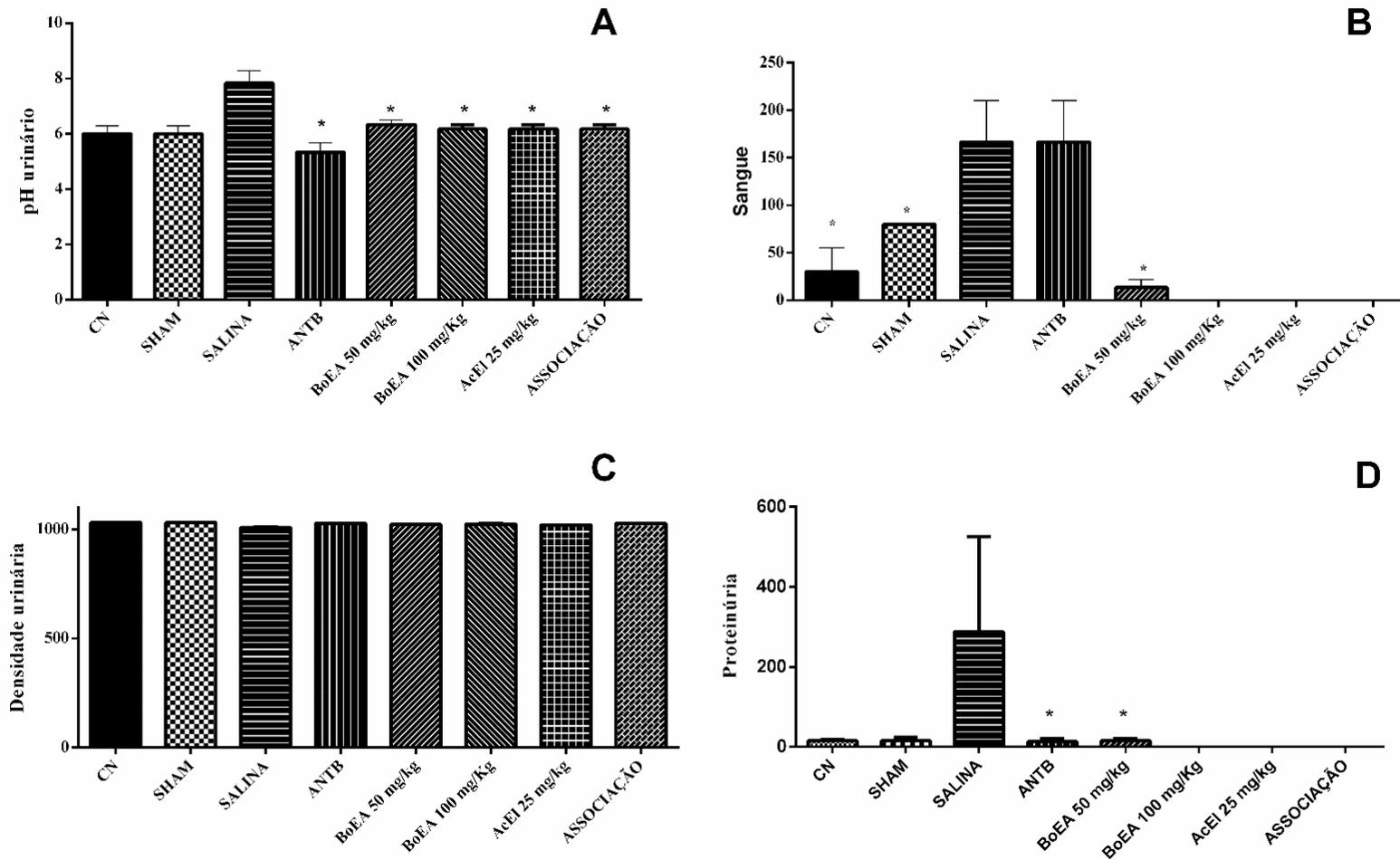


Figura 7: Efeito do tratamento oral da fração acetato de etila da *B. orellana*, sobre os parâmetros urinários nos diferentes grupos experimentais. Legenda: CN – Controle Negativo; Sham; CP – Controle Positivo; ANTB – tratados com antibiótico; BoEA – tratados com a fração acetato de etila do urucum; AcEI – Ácido Elágico; Associação - animais tratados com a associação do ácido elágico com a amoxicilina com clavulanato (25 mg/kg e 25 mg/ kg). Em A – pH urinário; B - Sangue; C – Densidade urinária; D – Proteinúria. \* $p < 0,05$  vs CP; # $p < 0,05$  vs CP (ANOVA, Turkey) (n=3).

Nos resultados da sedimentoscopia realizada com as amostras de urina, no período experimental, após 3 dias de tratamento, podemos observar que houve uma diminuição de hemácias e leucócitos nos grupos tratados com antibiótico (ANTB) e a fração acetato de etila BoEA 50mg/kg, em comparação ao grupo Salina, onde este indicou leucocitúria e presença incontável de hemácias. Os mesmos grupos tratados também demonstraram a presença de cilindros e cristais, como o fosfato triplo que é um indicativo de cistite (Tabela 7).

Tabela 7: Sedimentoscopia realizada nos diferentes grupos experimentais de acordo com os períodos experimentais proposto.

	<b>CN</b>	<b>SHAM</b>	<b>SALINA</b>	<b>ANTB</b>	<b>BoEA 50mg/kg</b>	<b>BoEA 100mg/kg</b>	<b>Ác.E 25mg/kg</b>	<b>Ác.E(12,5mg/kg) + ANTB(25mg/kg)</b>
<b>Células Epiteliais</b>	Presença	Raras	-	Raras	Raras	-	-	-
<b>Muco</b>	-	-	Presença	-	-	-	-	-
<b>Hemácias p/c</b>	-	11-13 p/c	Incontáveis	35-45 p/c	0-6 p/c	11-12 p/c	5-6 p/c	0-1 p/c
<b>Leucócitos p/c</b>	-	-	50-60 p/c	5-10 p/c	6-9 p/c	33 p/c	0-1 p/c	-
<b>Bactérias</b>	-	-	Presença	-	Raras	-	-	-
<b>Cilindros</b>	-	-	-	Granular	Hepático	-	-	-
<b>Cristais</b>	-	-	-	Fosfato Triplo e Oxalato de Cálcio	Fosfato Triplo e Oxalato de Cálcio	-	-	-

CN – Controle Negativo; SHAM – Grupo falso operado; Salina – Grupo tratado com salina; ANTB – Grupo tratado com 50mg/kg do Antibiótico; BoEA 50mg/kg – Grupo tratado com 50mg/kg da Fração Acetato de Etila; BoEA 100mg/kg – Grupo tratado com 100mg/kg da Fração Acetato de Etila; Ác.E – Grupo tratado com 25mg/kg do ácido elágico; Ác.E + ANTB – Grupo tratado com associação de 12,5 mg/kg do ácido elágico e 25mg/kg do antibiótico; P/C = por campo; - = negativo.

Na figura 8 é possível observar alguns dos achados na sedimentoscopia das amostras de urina nos grupos experimentais. Pode-se notar a presença de leucócitos e hemácias, uma célula epitelial na qual é considerada um achado normal (presente em todos os grupos experimentais). Na figura 9B observamos a presença de um cilindro hepático, encontrado em amostras do grupo tratado com a fração acetato de etila BoEA (50mg/kg). Cristal de fosfato triplo é apresentado nas amostras de urina dos grupos com antibioticoterapia e tratado com a BoEA (50mg/kg), estando demonstrado na figura 9C. Cristais de oxalato de cálcio também são encontrados em amostras dos mesmos grupos tratados, com antibiótico (ANTB) e a BoEA (50mg/kg), e observado na figura 9D. Apenas o grupo salina mostrou a presença de muco nas amostras de urina, ilustrado na figura 9E. Na figura 9F, percebe-se a presença de leucócitos e hemácias, além de hemácias crenadas, nas quais algumas são sinalizadas com setas na imagem, e estas foram encontradas em amostras dos grupos ANTB e BoEA (50mg/kg).

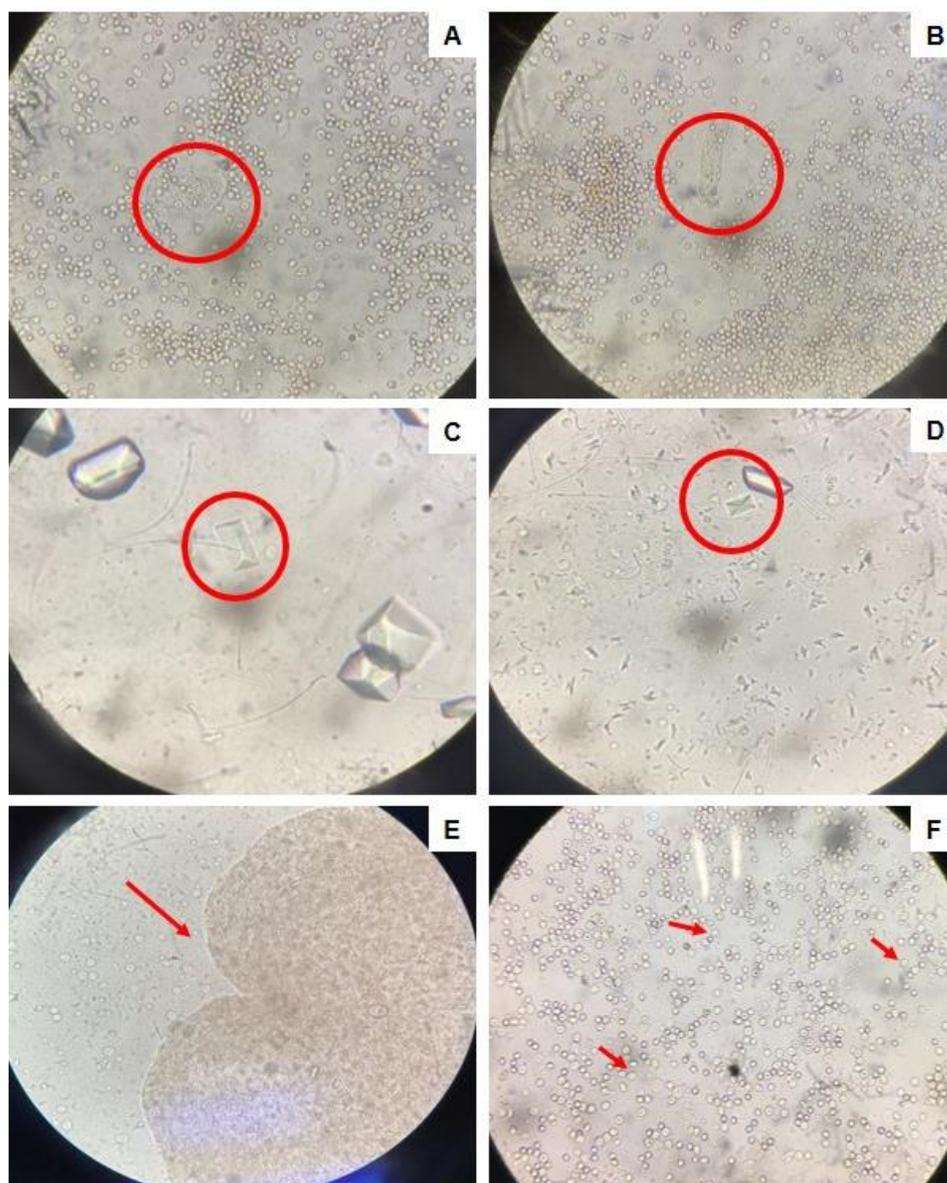


Figura 8: Sedimentoscopia das amostras de urina dos grupos experimentais. CN – Controle Negativo; SHAM; Salina; ANTB – Grupo tratado com Antibiótico; BoEA 50mg/kg - Grupo tratado com a dose de 50mg/kg da fração Acetato de Etila. 9A – Célula epitelial observada nos grupos CN, SHAM, ANTB e BoEA (50mg/kg); 9B – Cilindro hepático encontrado no grupo BoEA (50mg/kg); 9C – Cristal de fosfato triplo observado nos grupos ANTB e BoEA (50mg/kg); 9D – Cristal de oxalato de cálcio observado nos grupos ANTB e BoEA (50mg/kg); 9E – Presença de muco apresentada no grupo Salina; 9F – Hemácias crenadas encontradas nos grupos ANTB e BoEA (50mg/kg).

Na figura 9, os resultados dos achados da sedimentoscopia são ilustrados por grupo experimental. A figura 9 A apresenta as hemácias encontradas no grupo SHAM, após o período de três dias de experimento. Na figura 9 B podemos observar a presença de incontáveis hemácias apresentadas no grupo Salina, indicando hematúria. Podemos observar a presença de hemácias, hemácias crenadas e de leucócitos encontrados em amostras do grupo ANTB, ilustrado na

figura 9 C. Na figura 9 D também podemos observar a presença de hemácias, hemácias crenadas e leucócitos encontrados no grupo BoEA (50mg/kg), mas em uma quantidade inferior em comparação ao grupo ANTB.

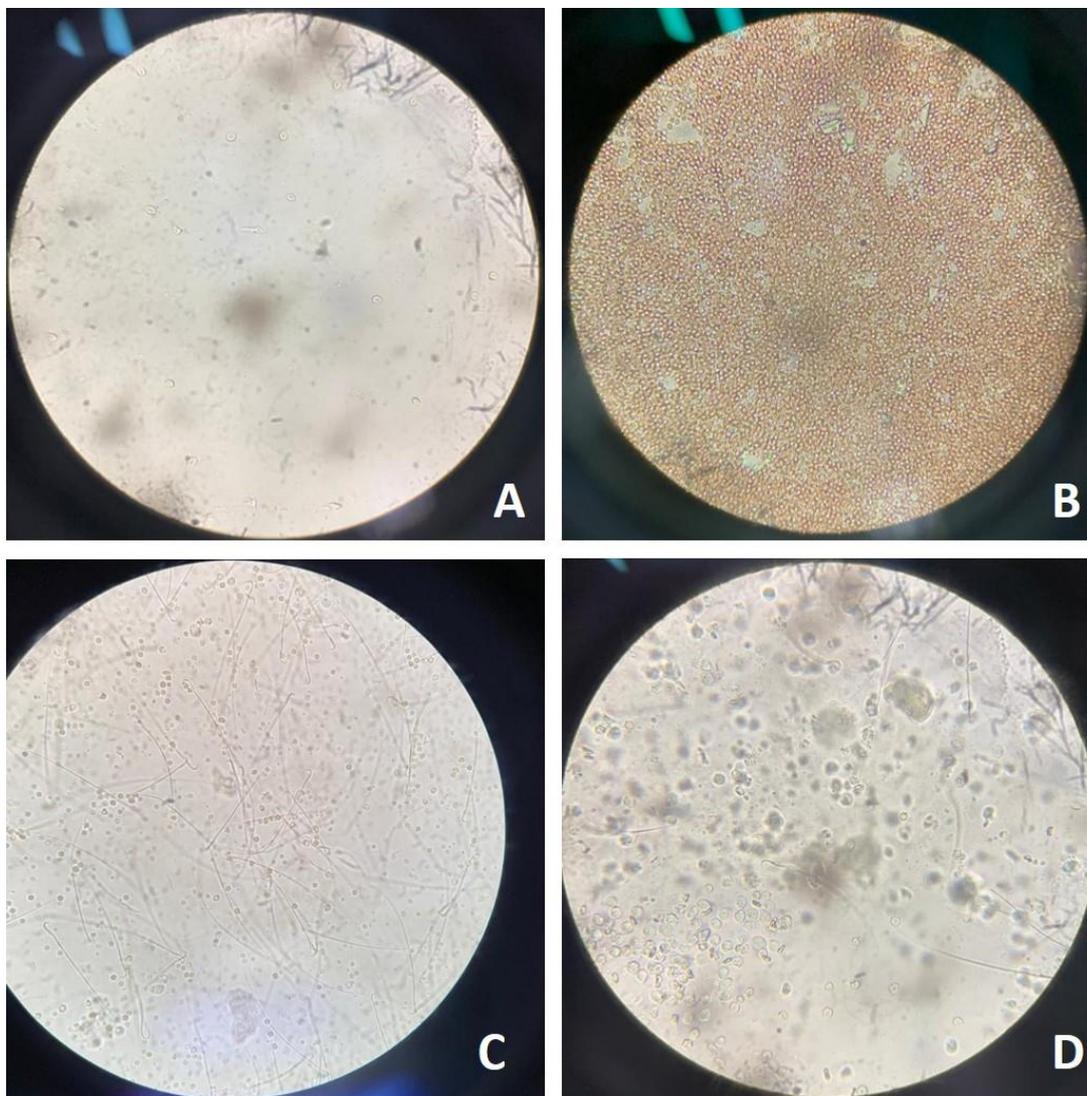


Figura 9: Sedimentoscopia das amostras de urina dos grupos experimentais. 9A - Grupo Sham: presença de hemácias; 9B – Grupo Salina: presença de incontáveis hemácias; 9C – Grupo Antibiótico (ANTB): presença de hemácias, hemácias crenadas e leucócitos; 9D – Grupo Fração Acetato de Etila (BoEA 50mg/kg): presença de hemácias, hemácias crenadas e leucócitos.

Analisando o número de unidades formadoras de colônias (UFC) após os diferentes tratamentos propostos, temos as seguintes considerações a serem feitas: não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos antibiótico quando comparado ao grupo ácido elágico e nem antibiótico versus associação, o que confirma eficácia terapêutica do ácido elágico contra cistite causada por

*E. coli* neste modelo de estudo. Além disso, demonstra-se também o efeito sinérgico e/ou potencializador do ácido elágico no que diz respeito a ação do antibiótico, uma vez que, no grupo associação as doses terapêuticas utilizadas foram as metades propostas para o grupo antibiótico e ácido elágico.

Ainda nesta análise, percebeu-se que o tratamento com BoEA reduziu a quantidade de bactérias na urina dos animais nas duas doses propostas, sem diferença estatística entre os dois grupos, o que nos leva a afirmar que seu efeito não é dose-dependente. Por fim, destaca-se que todos os tratamentos propostos foram capazes de reduzir significativamente o número de colônias formadas, uma vez, que houve diferença estatística significativa entre estes grupos quando comparados ao grupo salina (animais não tratados).

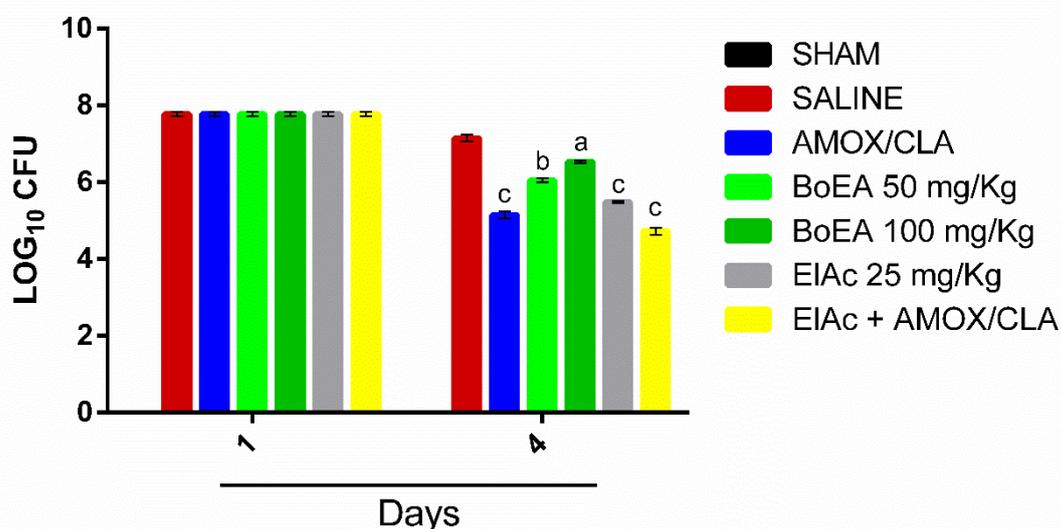


Figura 10: Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) dos grupos experimentais pertencentes ao estudo, realizada 24 horas após o 3º dia de tratamento experimental. Nota-se que houve uma redução no número de colônias após o término do tratamento com as doses de 50mg/kg e 100mg/kg da BoEA, e ANTB (50mg/kg) em relação ao grupo Salina, ou seja, houve um maior crescimento na produção de bactérias deste grupo. Além disso, houve menor produção de bactérias nos grupos tratados com ácido elágico (25mg/kg), e associação Ác.E + ANTB em relação ao grupo Salina. Legenda: CN – Controle Negativo; Sham; Salina; ANTB – tratados com antibiótico; BoEA 50mg/kg – tratados com a fração acetato de Etila da Bixa orellana; BoEA 100mg/kg – tratados com a fração acetato de Etila da Bixa orellana; Ác.E 25mg/kg – tratados com ácido elágico; Ác.E + ANTB – tratados com 12,5mg/kg de ácido elágico + 25mg/kg de antibiótico. (One way ANOVA seguido de Teste t de student. LOG10= logaritmo de 10). n = 3. p < 0.0001 vs salina.

## 5.5 Histologia

A figura 11 apresenta as análises histológicas da bexiga urinária nos diferentes grupos experimentais. O CN não apresenta células inflamatórias e hiperemia (figura 11 A). O grupo SHAM demonstra normalidade no epitélio, sem

inflamação e com discreta hiperemia (figura 11 B). No grupo salina, observa-se um processo inflamatório com hemorragia sub-epitelial (figura 11 C). O grupo tratado com antibiótico (figura 11 D), mostra a presença de hemácias, hiperemia e células inflamatórias (plasmócito; monócito). O grupo BoEA 50 mg/kg, apresenta uma discreta hemorragia e um epitélio mais íntegro com o início de um processo de repitelização. Também é possível perceber congestão e um discreto processo inflamatório (figura 11 E), enquanto no grupo BoEA 100 mg/kg observou-se hemorragia, congestão e um processo inflamatório bem pronunciado (figura 11 F). No grupo ácido elágico (figura 11 G) observou-se infiltrado inflamatório, congestão, e processo hemorrágico bastante discreto, quando comparado aos demais grupos. A camada muscular neste grupo, apresentou-se íntegra. Para o grupo associação (figura 11 H), pode-se identificar que para este tratamento houve maior preservação do epitélio, e em comparação aos demais grupos, este mostrou-se mais íntegro. Apresentou congestão e hemorragia e infiltrado inflamatório discretos e a camada muscular estava bastante preservada.

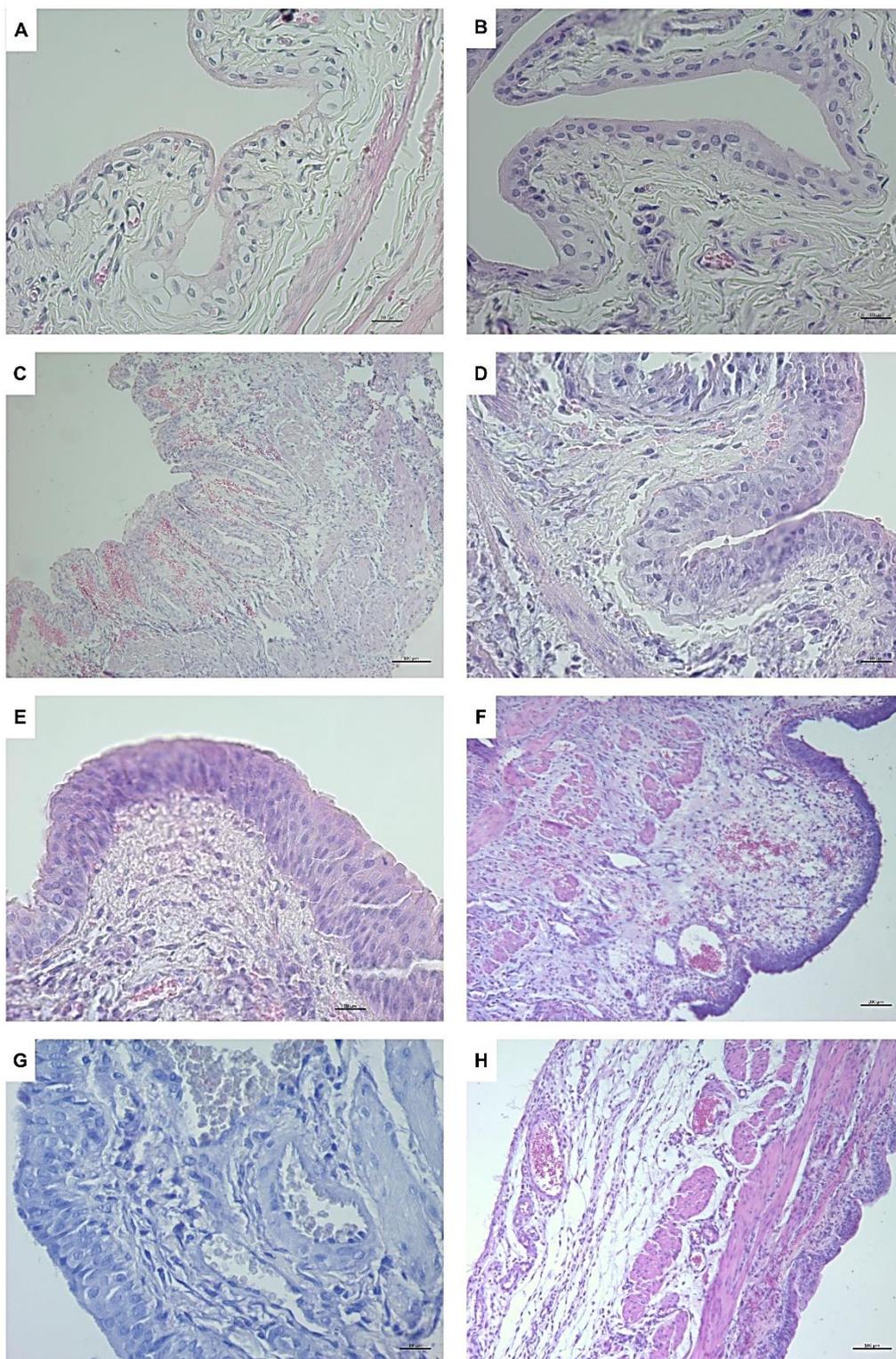


Figura 11: Histologia das amostras de bexiga urinária dos respectivos grupos experimentais. A - CN – Controle Negativo; B - SHAM; C - Salina; D – Antibiótico – Grupo tratado com 50mg/kg do Antibiótico; E - BoEA 50mg/kg – Grupo tratado com 50mg/kg da Fração Acetato de Etila; F - BoEA 100mg/kg – Grupo tratado com 100mg/kg da Fração Acetato de Etila; G - Ácido Elágico – Grupo tratado com 25mg/kg do ácido elágico; H - Associação – Grupo tratado com associação de 12,5 mg/kg do ácido elágico e 25mg/kg do antibiótico.

## 6 DISCUSSÃO

A validação do modelo cirúrgico experimental para desenvolvimento do quadro de bexiga neurogênica (BN) é o primeiro ponto de discussão em nossa pesquisa. Segundo Mckibben et al. (2015) a interrupção da organização morfológica entre o sistema nervoso central e periférico cessando a coordenação do processo fisiológico da micção, com armazenamento e esvaziamento anormais da bexiga caracteriza o quadro da BN. Em nosso experimento, com a técnica cirúrgica experimental de transecção completa da medula espinhal ocasionou-se a destruição de fibras nervosas dos tratos motores e sensoriais, ao nível da coluna vertebral torácica (T11 - T12), causando a paralisia completa dos membros pélvicos (paraplegia), e conseqüentemente a disfunção funcional do esvaziamento da bexiga urinária.

A confirmação da eficácia na reprodução deste modelo experimental em nosso estudo inicialmente ocorreu pela avaliação da motricidade, utilizando a escala de BBB, sendo que os animais avaliados obtiveram pontuação zero, caracterizando a paralisia completa dos membros pélvicos. Vários estudos corroboram com nossos resultados, confirmando que o modelo animal de transecção completa da medula espinhal promoveu de forma imediata a perda da função motora e sensitiva dos membros pélvicos e cauda (SAKAI et al., 2012; LUKOVIC et al., 2015). Sendo assim, fica claro que esse modelo é bastante eficaz para provocar o desenvolvimento da BN, a partir da indução da lesão medular completa em ratos, que o torna uma excelente alternativa para os estudos do quadro de BN, assim como o tratamento da cistite neurogênica (situação patológica originada a partir da perda do controle de esvaziamento da bexiga urinária nos indivíduos).

Após o estabelecimento do método experimental para o desenvolvimento do quadro da BN, constituiu-se como manejo dos animais, pela incapacidade de eles esvaziarem a bexiga naturalmente, a massagem vesical para esta finalidade. Semelhantemente ao realizado em nossa pesquisa, há na literatura trabalhos nos quais este tipo de manejo é de eleição para este objetivo. Santos et al. (2011), em seu estudo de padronização de modelo experimental para lesão medular (LM) em animais, também analisando ratos da linhagem Wistar, tinha como manejo clínico a massagem vesical para esvaziamento da bexiga. Vieira

et al. (2014) em seu trabalho de revisão sobre autocuidado para bexiga neurogênica, inclui a massagem suprapúbica como um dos auxílios para pessoas com lesão medular e que desenvolveram essa disfunção neurogênica.

Com o manejo dos animais submetidos a cirurgia experimental e diagnosticados com BN, procedeu-se a coleta da urina para identificação e isolamento dos microrganismos uropatogênicos e, nossos resultados demonstraram que a cistite nos animais em experimentação foi causada por *E. coli*. Gupta et al. (2011) discorre que em 75%-95% dos casos de cistite não complicada e pielonefrite, consiste principalmente de *Escherichia coli*, com outras espécies ocasionais de Enterobacteriaceae, como *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus saprophyticus*. E enfatiza que, uma vez que os padrões de resistência das cepas de *E. coli* que causam ITU não complicada, variam consideravelmente, entre as regiões e países, portanto, uma recomendação de tratamento específico pode não ser universalmente adequada. Cruz et al. (2006) avaliou a frequência de infecções do trato urinário (ITU) em pacientes cirróticos não hospitalizados, e em 4,9% desses pacientes as culturas de urina foram positivas e as bactérias encontradas foram *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Segundo Rasko et al. (2001), ITUs são causadas principalmente por um grupo geneticamente heterogêneo de *Escherichia coli* uropatogênica. Este, realizou um estudo analisando 90 cepas de *E. coli* isoladas de casos de pielonefrite e de cistite. Esses estudos, e outros presentes na literatura, corroboram com a nossa pesquisa mostrando casos de infecções do trato urinário associadas a *E. coli*, sendo esta considerada a principal causa de ITU.

Uma outra abordagem realizada em nossa pesquisa foi a identificação dos compostos presentes na fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *Bixa orellana*. A partir da avaliação dos dados cromatográficos, foi possível determinar classes de metabólitos secundários, observando-se que a classe encontrada foi a dos flavonoides e ácidos fenólicos. De acordo com as análises dos grupos de frações concluímos que os flavonoides foram a classe majoritária. Sendo assim, essa variedade e complexidade de compostos presentes na fração acetato de etila (BoEA) aumenta ainda mais as possibilidades de a mesma apresentar atividades biofarmacológicas de interesse para o ser humano.

Estudos com esta espécie vegetal observaram a presença dessa classe química indicando importância quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Dentre esses estudos, Lima Viana et al., (2018) apresentou que as frações do extrato das folhas de urucum (fração hexânica, fração clorofórmica e fração acetato de etila), demonstraram a presença de alcalóides, esteróides e saponinas nas três frações, e somente na fração acetato de etila foi encontrada presença de flavonóides, flavonas, flavononóis e xantonas. E a partir da caracterização química do BoEA (o extrato mais ativo), este revelou que o kaempferol-3-O-coumaroil glicose é seu principal componente, sendo considerado composto majoritário e possivelmente responsável pela atividade antimicrobiana.

Biharee et al., (2020) em seu trabalho de revisão, enfatiza que devido a resistência desenvolvida a antimicrobianos sintéticos, aumentou o interesse na pesquisa sobre flavonoides, tendo em vista que vários flavonóides foram considerados eficazes contra microrganismos patogênicos. Os resultados da revisão mostraram que os flavonóides apresentam efeito antimicrobiano ao inibir os fatores de virulência, bomba de efluxo, formação de biofilme, ruptura da membrana, síntese do envelope celular, síntese de ácido nucleico e inibição da motilidade bacteriana. BARTMAŃSKA et al., (2018) em seu estudo avaliou o efeito antimicrobiano de vários extratos, cloreto de metileno, acetona, acetato de etila e metanol, e flavonóides obtidos a partir da planta lúpulo (*Humulus lupulus L.*, *Cannabaceae*). Sete flavonóides, entre eles dois naturais ( $\alpha$ ,  $\beta$ -diidroxantohumol e 8-prenilnaringenina) apresentaram atividade significativa contra as cepas de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à metilina e *Staphylococcus epidermidis*. Dessa forma, entendemos que os compostos presentes na fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *Bixa orellana*, espécie vegetal avaliada no nosso estudo e que apresentou os flavonoides como classe majoritária, aumentam as possibilidades de a BoEA demonstrar atividades biofarmacológicas de interesse para o ser humano.

Dente os grupos de frações da nossa pesquisa, foi possível caracterizar quimicamente o grupo 10 (G10), substância identificada como ácido elágico (elagitanino). Este já foi descrito em outros estudos do grupo com atividade antibacteriana e anti-inflamatória. O ácido elágico é uma molécula fenólica que

pode estar presente na forma livre em algumas espécies de plantas como um produto de seu metabolismo, ou pode ser encontrada em seus precursores, os elagitaninos (ME CARRETERO, 2000). O ácido elágico foi relatado como antimicrobiano, devido ao seu efeito sobre bactérias, fungos e parasitas. Alguns extratos da planta *Pteleopsis hylodendron*, derivados principalmente do ácido elágico, mostraram atividade contra certas bactérias patogênicas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Salmonella pyogenes* (ASCACIO-VALDÉS, 2013).

Dentro do nosso estudo, também foi possível determinar a CIM e CBM de algumas subfrações presentes na fração acetato de etila (BoEA) das folhas de urucum testadas contra amostra de *E. coli*, isolada a partir do modelo experimental, confirmando a atividade antimicrobiana apresentada em estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa (LIMA VIANA et al., 2018). No entanto, o extrato da BoEA apresentou um melhor resultado (CIM - 6,25 mg/mL e CBM - 6,25mg/mL) comparado a menor concentração inibitória das subfrações, com a CIM (25 mg/mL), provando uma ação sinérgica muito mais eficiente contra *E. coli*. Em estudo, Simonetti et al. (2016) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* contra *E. coli* e *L. monocytogenes*, e observou que os extratos da espécie de *E. anomala* apresentaram melhor potencial de ação antimicrobiana frente a *E. coli* onde o extrato etanólico apresentou CIM de 2.500 µg/mL e CBM de 10.000 µg/mL, além do extrato hexânico e de acetato de etila que apresentaram a CIM de 5.000 µg/mL. Quanto à espécie *P. salutare*, o extrato etanólico apresentou sua CIM de 5.000 µg/mL (bacteriostático), e os extratos hexânico, clorofórmico e de acetato de etila de *P. salutare* apresentaram CIM de 10.000 µg/mL (bacteriostático).

Zago et al. (2009), em seu trabalho buscou estudar as possíveis interações entre a canela (*Cinnamomun zeylanicum*), o capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), a hortelã (*Mentha piperita*), o gengibre (*Zingiber officinalle*), o cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e o alecrim (*Rosmarinus Officinalis*), com determinadas drogas antimicrobianas, contra a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Ocorreram cinco interações com sinergismo entre os óleos essenciais e as drogas testadas nos ensaios contra *E. coli*, sendo os óleos de alecrim e capim-

cidreira os que interferiram na ação antimicrobiana das drogas selecionadas. Rezende et al. (2011) realizou um trabalho com o objetivo de testar a ação herbicida dos extratos metanólicos de caule e raiz de *Caryocar brasiliense*, conhecido como pequi, em ensaios de germinação de sementes de *Panicum maximum*, conhecida por capim-colonião, analisando sua germinação, alongação do caule e da raiz. Os dois extratos testados apresentaram potenciais herbicidas, e essa atividade herbicida dos extratos brutos, bem como das frações e subfrações, estão associadas ao fenômeno de sinergismo entre os compostos presentes nestes. Desta forma, podemos considerar que um único constituinte ativo dificilmente pode reproduzir a eficácia de todo o extrato. No caso do nosso estudo, a fração acetato de etila (BoEA) do extrato de *B. orellana* revelou um desempenho sinérgico muito promissor, em comparação aos grupos de frações isolados.

Na fase experimental *in vivo*, após o tratamento dos grupos experimentais propostos, parâmetros urinários e hematológicos foram analisados objetivando avaliar a eficácia terapêutica. Entretanto, antes de discutirmos estes parâmetros, é importante destacar que segundo Dantas et al. (2006) cada espécie de animal possui valores de referências específicos inerentes a sua fisiologia e que podem existir variações que estão relacionadas ao sexo, linhagem e genótipo, podendo estas variações serem decorrentes de diversos fatores como: idade, dieta, manuseio e ambiente. Neste ponto, enfatizamos que essas variáveis fisiológicas foram controladas nos grupos experimentais estudados, uma vez que se tratava de animais do mesmo sexo, idade, linhagem, dieta, procedência, manejo (manipulação) e ambiente.

Desta forma, é importante destacar que os valores hematológicos de referência adotados em nosso estudo correspondem aos valores dos parâmetros obtidos do grupo controle negativo da nossa amostragem (animais saudáveis, que não foram submetidos a nenhum procedimento). Lima et al. (2014), destacaram que estes parâmetros refletem um critério importante para a avaliação da homeostase, das modificações induzidas por processos patológicos e dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais.

Embora Jacob-Filho et al. (2017) tenham demonstrado em sua pesquisa valores hematológicos de referência para ratos em diferentes idades e fases de

desenvolvimento, a avaliação comparativa das análises hematológicas apresentada por estes autores e na literatura não apresenta similaridade com os valores encontrados em nosso estudo. Dantas et al. (2006), Mustafina et al. (2013), Novozhilov et al. (2012) e Rangaraj et al. (2014), também relataram em suas pesquisas descrições de diferentes valores de referência para os parâmetros analisados em nossa pesquisa, mesmo tratando-se de animais de mesmo sexo, raça e idade. A variação nesses parâmetros de referência é atribuída a fatores como metodologia utilizada na coleta do sangue, o local da coleta, horário do dia em que foi realizada, assim como podem ser resultantes de diferenças de ordem ambiental, e pela metodologia empregada em cada pesquisa (CARVALHO et al., 2009; IHEDIOHA et al., 2013).

Iniciaremos nossa análise hematológica pelo parâmetro leucocitário. Lomaco (2019) em sua pesquisa sobre índices de leucócitos no sangue em ratos machos de diferentes idades afirmou fisiologicamente que o aumento na contagem destas células é acompanhado pelo aumento da idade, ou seja, ocorre aumento na contagem total de leucócitos, na porcentagem de neutrófilos (segmentados), eosinófilos e monócitos, bem como por uma diminuição no número de linfócitos, em animais até idade de 12 meses. Em nossa pesquisa, observamos nos resultados do hemograma significância estatística na contagem diferencial de leucócitos em neutrófilos segmentados e linfócitos.

Os animais do grupo salina apresentaram um aumento estatisticamente significativo na contagem diferencial de neutrófilos em relação ao grupo controle negativo. Este fato pode ser explicado em resposta a lesão tecidual causada pela cirurgia experimental, que induziu um processo inflamatório e infeccioso, e conseqüentemente aumento da produção destas células. Estes resultados corroboram com os de Alves-Filho et al. (2008) que afirmaram que os neutrófilos são as principais células prontamente recrutadas em resposta à infecção ou lesão do tecido. Com esta análise podemos confirmar que o modelo cirúrgico experimental proposto em nossa pesquisa foi capaz de promover um processo inflamatório e infeccioso provocado pela cistite neurogênica.

Ainda nesta análise, nossos resultados demonstraram que o perfil neutrofílico dos animais do grupo BoEA e ANTB, também apresentaram significância estatística quando comparados ao grupo salina, com diminuição

dos níveis de neutrófilos, o que demonstra uma melhora dos no processo inflamatório e infeccioso dos grupos experimentais tratados. A pesquisa de Santos & Vera (2000) corrobora com nossos achados. Estes autores demonstraram de que o tratamento com antibióticos diminui a resposta inflamatória durante um processo infeccioso causado por bactérias. Aqui, com base nos nossos resultados, e com o descrito na literatura para a resposta neutrofílica associada com o tratamento com antibiótico, podemos afirmar que a diminuição nos níveis de neutrófilos ocasionada pela BoEA confirma a eficácia deste fitoquímico para o tratamento das bactérias uropatogênicas causadoras da cistite neurogênica no modelo experimental proposto. As propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana da fração acetato de etila das folhas do urucum já foram demonstradas por Lima Viana et al. (2018). Estes autores demonstraram as propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana do tratamento com esse composto fitoquímico em modelo experimental de peritonite bacteriana, observando redução dessas células para o processo inflamatório.

Quanto a urinálise dos grupos experimentais, observamos sinal de hematúria no grupo salina, devido a coloração avermelhada e presença de sangue na urina, sendo um indicativo em casos de cistite, dentre outros casos de infecções do trato urinário (ITU). Observamos também que, em relação a presença de sangue na urina, o grupo BoEA apresentou uma redução significativa destes valores quando comparado aos grupos Salina e ANTB. Nas amostras de urina analisadas em nosso estudo, foi possível perceber um elevado grau de hematúria macroscópica e microscópica. Em seus estudos Paula et al. (2010), ao analisar o comportamento clínico dos animais pós lesão medular, (*Rattus norvegicus*), pertencentes à linhagem Wistar, machos, adultos jovens, pesando  $300g \pm 50g$ , observou que os animais que não apresentaram espontaneidade na excreção urinária, obtiveram alto índice de infecção urinária com presença de hematúria, mesmo quando submetidos a tratamento farmacológico.

Nesta mesma análise, pode-se ainda destacar que em amostras dos grupos ANTB e BoEA (50mg/kg), observou-se a presença de hemácias crenadas, um indicativo da origem da hematúria. A hematúria de origem urológica (não-glomerular), caracteriza-se por hemácias isomórficas

conservando seus aspectos usuais (tamanho uniforme e morfologia) semelhantes às encontradas na circulação sanguínea. Sendo acompanhadas eventualmente de hemácias fantasmas ou crenadas (PAULO, 2012).

Quanto a análise do pH, podemos perceber que o grupo BoEA (50mg/kg), CN e SHAM apresentaram valores semelhantes na análise do pH, o que confirma a eficácia do modelo para indução da cistite. Heilberg & Schor (2003) relataram que os eritrócitos e leucócitos são lisados em urinas com pH > 6,0 e que, o pH urinário >7,5, detectado por fitas reagentes também sugere fortemente ITU, o que ocorreu em nosso estudo.

Um outro ponto interessante a ser discutido é a presença de proteína na urina dos animais do grupo salina, indicando possivelmente glomerulonefrite, condição comum em pacientes com BN. Nesta análise, há o indicativo que os tratamentos com a fração acetato de etila e antibiótico podem estar sendo eficazes, ou até mesmo terapêuticos nos animais dos grupos BoEA e ANTB. Proteínas são normalmente encontradas na urina em pequenas quantidades (BACILA et al., 2003), e de acordo com, Garcia-Navarro (1996) e Meyer et al. (1995), a proteinúria pode estar relacionada ao aumento da densidade urinária, já que em uma urina mais concentrada, é mais fácil detectar traços de proteína.

Por fim após 24 horas do protocolo cirúrgico, os grupos experimentais apresentaram a mesma contagem de *Unidade Formadora de Colônias* (CFU), com exceção do grupo SHAM, onde este não demonstrou crescimento microbiano em nenhum dos tempos experimentais. O grupo tratado com salina teve um aumento na proporção de bactérias comparado ao parâmetro de um dia após a cirurgia e aos outros grupos de tratamento. O grupo de animais tratados com a dose de 50mg/kg do antibiótico demonstrou um número inferior de crescimento de colônias comparado ao grupo de animais tratados com 50mg/kg da BoEA no período de quatro dias após cirurgia somando três dias de tratamento, ainda assim, a BoEA apresentando uma atividade antimicrobiana.

## 7 CONCLUSÃO

A fração acetato de etila das folhas da *B. orellana* (BoEA) e seu composto fitoquímico isolado, o ácido elágico apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* isolada em modelo de bexiga neurogênica em ratos, e *in vivo*

para o tratamento terapêutico experimental no mesmo modelo. Na análise *in vitro*, a BoEA apresentou melhores resultados, provando uma ação sinérgica mais eficiente contra a *E. coli* isolada em modelo experimental. Por outro lado, os ensaios *in vivo* demonstraram que o ácido elágico e sua associação com o antibiótico (amoxicilina com clavulanato) utilizados para o tratamento dos animais, melhorou significativamente os parâmetros hematológicos, urinários e de cultura bacteriana. Desta forma, este trabalho pode contribuir no processo de busca de alternativas terapêuticas com o uso de plantas medicinais, principalmente com o uso da *B. orellana* e de seus compostos fotoquímicos para o tratamento de infecções urinárias decorrentes do quadro de bexiga neurogênica.

## REFERÊNCIAS

ALVES-FILHO, José C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30, n. 7, p. 3-9, 2008.

AMARENCO, Gerard et al. Diagnosis and clinical evaluation of neurogenic bladder. **European journal of physical and rehabilitation medicine**, v. 53, n. 6, p. 975-980, 2017.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1817-1820, 2010.

ASCACIO-VALDÉS, Juan Alberto et al. Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano. **Revista mexicana de ciencias farmacéuticas**, v. 44, n. 2, p. 36-40, 2013.

ASHAOLU, J. O. et al. Effect of monosodium glutamate on hematological parameters in Wistar rats. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 3, n. 6, p. 219-222, 2011.

BACILA, M. *Bioquímica veterinária*. 2.ed. São Paulo: Robe, 2003, 581p.

BADKE, Marcio Rossato et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery*, v. 15, n. 1, pág. 132-139, 2011.

BARTMAŃSKA, Agnieszka et al. Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2059, 2018.

BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, 12(1):1-21, 1995.

BENEDETTO, Paolo DI. The neurogenic bladder and the physiatrist. 2017.

DONOVAN, William H. Spinal cord injury—past, present, and future. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 30, n. 2, p. 85, 2007.

BIHAREE, Avadh et al. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, p. 104720, 2020.

BLOK, B. et al. Guidelines on neuro-urology. **Eur Urol**, p. 17-23, 2015.

BOWES, Amy L.; YIP, Ping K. Modulating inflammatory cell responses to spinal cord injury: all in good time. **Journal of neurotrauma**, v. 31, n. 21, p. 1753-1766, 2014.

BRAGA-SILVA J, GEHLEN D, ROMAN JA, MACHADO DC, COSTA JCD, FAÚNDEZ M, ORSI VV, BRAGA R. Modelo experimental de lesão

raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais. **Acta Ortop Bras**, 15(3): 155-157; 2007.

CACERES, Armando et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 85-88, 1995.

CALLENS, Amanda J.; BARTGES, Joseph W. Urinalysis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 4, p. 621-637, 2015.

CARVALHO, G. D. et al. Clinical evaluation of laboratory rats (*Rattus norvegicus* Wistar strain): sanitary biological and physiological parameters. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

COHEN, Samuel M. et al. Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 3, p. 337-347, 2007.

CRUZ, Rita de Cássia Reis et al. Urinary tract infection in non-hospitalized patients with cirrhosis and no symptoms of urinary tract infection: a case series study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 380-383, 2006.

DANTAS, Jailson Araújo et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*. **Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DONOVAN, William H. Spinal cord injury—past, present, and future. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 30, n. 2, p. 85, 2007.

DOS SANTOS, Fernanda; FONSECA, Renato ID. INVESTIGATION OF THE HEMATURIA ORIGIN IN THE URINARY SEDIMENTOSCOPY BASED ON THE ERYTHROCYTE MORFOLOGY. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 4, 2013.

DRAKE, Marcus John et al. Neurogenic lower urinary tract dysfunction: Clinical management recommendations of the Neurologic Incontinence committee of the fifth International Consultation on Incontinence 2013. **Neurourology and urodynamics**, v. 35, n. 6, p. 657-665, 2016.

DUBBS, Sarah B.; SOMMERKAMP, Sarah K. Evaluation and management of urinary tract infection in the emergency department. **Emergency Medicine Clinics**, v. 37, n. 4, p. 707-723, 2019.

ELIAS, M. E. A. et al. Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana*) in agroforestry on an Amazonian ferralsol. **Experimental Agriculture**, v. 38, n. 3, p. 277, 2002.

FERES, Marcia C. et al. Implications for the use of acid preservatives in 24-hour urine for measurements of high demand biochemical analytes in clinical laboratories. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2322-2325, 2011.

FLEISCHER, T. C. et al. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 136-138, 2003.

GALINDO-CUSPINERA, Veronica; RANKIN, Scott A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound (s) in commercial water-soluble annatto extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2524-2529, 2005.

GALINDO-CUSPINERA, Veronica; WESTHOFF, Dennis C.; RANKIN, Scott A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. **Journal of food protection**, v. 66, n. 6, p. 1074-1078, 2003.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Manual de urinálise veterinária. São Paulo: Varela, 1996. 95p.

GLASER, Alexander P.; SCHAEFFER, Anthony J. Urinary tract infection and bacteriuria in pregnancy. **Urologic Clinics**, v. 42, n. 4, p. 547-560, 2015.

GUPTA, Kalpana et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 5, p. e103-e120, 2011.

GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara. Urinary tract infection. **Annals of internal medicine**, v. 167, n. 7, p. ITC49-ITC64, 2017.

HAMID, Rizwan et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury. **World journal of urology**, v. 36, n. 10, p. 1517-1527, 2018.

HANNAN, Thomas J.; HUNSTAD, David A. A murine model for *Escherichia coli* urinary tract infection. In: Bacterial Persistence. **Humana Press**, New York, NY, 2016. p. 159-175.

HEIDARY, Maryam; MOMTAZ, Hassan; MADANI, Mahboobeh. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 4, 2014.

HEILBERG, Ita Pfeferman; SCHOR, Nestor. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.

HOOTON, Thomas M. et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 5, p. 625-663, 2010.

IHEDIOHA, John Ikechukwu; NOEL-UNEKE, Onyinyechukwu Ada; IHEDIOHA, Thelma Ebele. Reference values for the serum lipid profile of albino rats (*Rattus norvegicus*) of varied ages and sexes. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 93-99, 2013.

JACOB FILHO, Wilson et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. **The Aging Male**, v. 21, n. 2, p. 145-148, 2017.

KOT, Barbara. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. **Polish journal of microbiology**, v. 68, n. 4, p. 403, 2019.

L PRADA, Ariadna et al. Development and characterization of *Cassia grandis* and *Bixa orellana* nanoformulations. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2057-2065, 2016.

LENTZ, David L. et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 63, n. 3, p. 253-263, 1998.

LI, Lai-Fung; LEUNG, Gilberto Ka-Kit; LUI, Wai-Man. Sacral nerve stimulation for neurogenic bladder. **World neurosurgery**, v. 90, p. 236-243, 2016.

LIAO, Limin. Evaluation and management of neurogenic bladder: what is new in China?. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 18580-18600, 2015.

LIMA, Claudio Moreira et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**, v. 10, n. 3, 2014.

LIMA, F. C. S. et al. Ação do estanozolol sobre a histologia renal e hepática em ratos treinados com natação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1295-1304, 2020.

LIMA VIANA, José et al. Hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* leaves decrease the inflammatory response to *Mycobacterium abscessus* Subsp. *Massiliense*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

LUKOVIC, Dunja et al. Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015.

MAJOLO, Cláudia. Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L.(urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. 2010.

MANACK, Aubrey et al. Epidemiology and healthcare utilization of neurogenic bladder patients in a US claims database. **Neurourology and urodynamics**, v. 30, n. 3, p. 395-401, 2011.

- MCKIBBEN, Maxim J. et al. Urinary tract infection and neurogenic bladder. **Urologic Clinics**, v. 42, n. 4, p. 527-536, 2015.
- ME, CARRETERO ACCAME. Compuestos fenólicos. **Taninos Panorama Actual Med**, v. 24, n. 235, p. 633-636, 2000.
- MEYER, Fernando et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 3, p. 203-8, 2003.
- MUSTAFINA, O. K. et al. Hematologic indices in different age wistar rats, receiving a balanced semi-synthetic vivary diet. **Voprosy pitaniia**, v. 82, n. 2, p. 10-16, 2013.
- NEMZEK, J. A. et al. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. **Inflammation research**, v. 50, n. 10, p. 523-527, 2001.
- NETO, Roberval Nascimento Moraes et al. Compounds isolated from Bixa orellana: evidence-based advances to treat infectious diseases. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 3, 2020.
- NEUHUBER, Birgit et al. Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 9, n. 4, p. 390-399, 2008.
- NICOLLE, Lindsay E. Urinary tract infections in patients with spinal injuries. **Current infectious disease reports**, v. 16, n. 1, p. 390, 2014.
- NOVOZHILOV, A. V.; KATYUKHIN, L. N.; FEIZULLAEV, B. A. Dynamics of hematologic parameters and of the erythrocyte deformability index at the juvenal period of rats and guinea pigs. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 48, n. 1, p. 32-42, 2012.
- NSEYO, Unwanaobong; SANTIAGO-LASTRA, Yahir. Long-term complications of the neurogenic bladder. **Urologic Clinics**, v. 44, n. 3, p. 355-366, 2017.
- OTERO, R. et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, n. 71, p. 493-504, 2000.
- OYEDEJI, O. A. et al. Essential oil composition of Piper guineense and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 19, n. 4, p. 362-364, 2005.
- OYINBO, Charles Aidemise. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 71, n. 2, p. 281-99, 2011.

PAULA, A. A. et al. Análise do efeito clínico do laser de baixa intensidade em ratos Portadores de lesão medular traumática. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação– Universidade do Vale do Paraíba, 2010.

PAULO, Cláudia Pereira. Avaliação da eficácia do dismorfismo eritrocitário no sedimento urinário como diagnóstico diferencial da origem da hematúria glomerular ou não glomerular. 2012.

PHÉ, Véronique; CHARTIER–KASTLER, Emmanuel; PANICKER, Jalesh N. Management of neurogenic bladder in patients with multiple sclerosis. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 5, p. 275-288, 2016.

PIERPAOLI, Elisa et al. Supplementation with tocotrienols from *Bixa orellana* improves the *in vivo* efficacy of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse model of infected wound. **Phytomedicine**, v. 36, p. 50-53, 2017.

PROCHNOW, André Aozani; GONÇALVES, Luiz Felipe Santos. Hematúria. **Revista HCPA**. Porto Alegre. Vol. 20, n. 3 (nov. 2000), p. 247-254, 2000.

RAEISPOUR, Maryam; RANJBAR, Reza. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

RAGA, Dennis D. et al. A bioactive sesquiterpene from *Bixa orellana*. **Journal of natural medicines**, v. 65, n. 1, p. 206-211, 2011.

RANGARAJ, Nagarjun et al. Do blood sampling sites affect pharmacokinetics ?. 2014.

RASKO, David A. et al. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 8, p. 1041-1049, 2001.

REDSHAW, Jeffrey D. et al. Protocol for a randomized clinical trial investigating early sacral nerve stimulation as an adjunct to standard neurogenic bladder management following acute spinal cord injury. **BMC urology**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

REINE, Nyssa J.; LANGSTON, Cathy E. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 20, n. 1, p. 2-10, 2005.

REZENDE, Gláucia Aparecida Andrade; TERRONES, Manuel Gonzalo Hernandez; REZENDE, Douglas Messias Lamounier Camargos. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi). **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, 2011.

ROJAS, Jhon J. et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2006.

ROMO, Paholo G. Barboglio et al. Non-surgical urologic management of neurogenic bladder after spinal cord injury. **World journal of urology**, v. 36, n. 10, p. 1555-1568, 2018.

SAKAI, Kiyoshi et al. As células-tronco derivadas da polpa dentária humana promovem a recuperação locomotora após a transecção completa da medula espinhal do rato por vários mecanismos neuro-regenerativos. **The Journal of Clinical Research**, v. 122, n. 1, pág. 80-90, 2012.

SANTOS, Guido; VERA, Julio. The Role of Age, Neutrophil Infiltration and Antibiotics Timing in the Severity of Streptococcus pneumoniae Pneumonia. Insights from a Multi-Level Mathematical Model Approach. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8428, 2020.

SANTOS, Gustavo Bispo dos et al. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 87-91, 2011.

SCHÄFER, Werner et al. Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry, and pressure-flow studies. **Neurourology and Urodynamics: Official Journal of the International Continence Society**, v. 21, n. 3, p. 261-274, 2002.

SCHAEFFER, Anthony J.; NICOLLE, Lindsay E. Urinary tract infections in older men. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 562-571, 2016.

SCHLAGER, Theresa A. et al. Bacteriuria in children with neurogenic bladder treated with intermittent catheterization: natural history. **The Journal of pediatrics**, v. 126, n. 3, p. 490-496, 1995.

SCHMUCH, Jana et al. Extract from Rumex acetosa L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of Porphyromonas gingivalis by epicatechin-3-O-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0120130, 2015.

SHARIF-ALHOSEINI, Mahdi; RAHIMI-MOVAGHAR, Vafa. Animal models in traumatic spinal cord injury. **Topics in Paraplegia**, p. 209-228, 2014.

SHILPI, Jamil Ahmad et al. Preliminary pharmacological screening of Bixa orellana L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 264-271, 2006.

SIMONETTI, Eveline et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de Eugenia anomala e Psidium salutare (Myrtaceae) frente à Escherichia coli e

Listeria monocytogenes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 9-18, 2016.

STOFFEL, John T. Detrusor sphincter dyssynergia: a review of physiology, diagnosis, and treatment strategies. **Translational andrology and urology**, v. 5, n. 1, p. 127, 2016.

VASUDEVA, Pawan; MADERSBACHER, Helmut. Factors implicated in pathogenesis of urinary tract infections in neurogenic bladders: some revered, few forgotten, others ignored. **Neurourology and urodynamics**, v. 33, n. 1, p. 95-100, 2014.

VENKATESH, Katari et al. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. **Cell and tissue research**, p. 1-27, 2019.

VIEIRA, Caroline Evelin Nascimento Kluczynik et al. Autocuidado para bexiga neurogênica em pessoas com lesão medular: revisão integrativa. 2014.

VIGIL, Humberto R.; HICKLING, Duane R. Urinary tract infection in the neurogenic bladder. **Translational andrology and urology**, v. 5, n. 1, p. 72, 2016.

VILAR, Daniela de Araujo et al. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa orellana L.: a review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VORAVUTHIKUNCHAI, Supayang Piyawan; SUWALAK, Sakol; MITRANAN, Winyou. Ellagitannin from Quercus infectoria eradicates intestinal colonization and prevents renal injuries in mice infected with Escherichia coli O157: H7. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 10, p. 1366-1372, 2012.

WANG, Chao-Min et al. Structure elucidation of procyanidins isolated from Rhododendron formosanum and their anti-oxidative and anti-bacterial activities. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12787-12803, 2015.

WEN, Weiwei; ALSEEKH, Saleh; FERNIE, Alisdair R. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. **Current opinion in plant biology**, v. 55, p. 100-108, 2020.

ZAGO, Juliana AA et al. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against Staphylococcus aureus and Escherichia coli strains from human infections. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

**ANEXO A – ESCALA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN (BBB)**

<b>ESCORE</b>	<b>DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS</b>
<b>0</b>	Nenhum movimento observável dos membros posteriores.
<b>1</b>	Ligeiro (limitado) movimento de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
<b>2</b>	Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e ligeiro movimento de outra articulação.
<b>3</b>	Extenso movimento de duas articulações dos membros posteriores.
<b>4</b>	Ligeiro movimento de mais de três articulações dos membros posteriores.
<b>5</b>	Ligeiro movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira articulação.
<b>6</b>	Extenso movimento de duas articulações e ligeiro movimento da terceira articulação.
<b>7</b>	Extenso movimento das três articulações dos membros posteriores.
<b>8</b>	Arrastamento sem suporte de carga ou colocação plantar da pata sem suporte de carga.
<b>9</b>	Apoio plantar da pata com suporte de carga apenas na fase de apoio (ou seja, quando estática) ou pisada plantar ocasional, frequente ou inconsistente com suporte de carga e sem pisada plantar.
<b>10</b>	Apoio plantar com suporte de carga ocasional e nenhuma coordenação membro posterior-anterior.
<b>11</b>	Apoio plantar com suporte de carga frequente-consistente e coordenação ocasional dos membros posterior-anterior.
<b>12</b>	Apoio plantar com suporte de carga frequente-consistente e coordenação ocasional dos membros posterior-anterior.
<b>13</b>	Apoio plantar com peso frequente-consistente e coordenação frequente dos membros posterior-anterior.
<b>14</b>	Apoio plantar com peso constante, coordenação consistente de membro posterior-anterior e posição da pata predominantemente em rotação (interna ou externa) durante locomoção, tanto quando começa o contato inicial com a superfície, como antes de mover os dedos ao final da fase de suporte ou apoio plantar frequente, coordenação consistente membros posterior-anterior e passada dorsal ocasional.
<b>15</b>	Apoio plantar consistente, coordenação consistente de membros posterior-anterior sem movimento nos dedos ou movimento ocasional dos dedos dos pés durante o avanço do membro seguinte; posição da pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
<b>16</b>	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento.
<b>17</b>	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e no instante do movimento dos dedos dos pés.
<b>18</b>	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição

	da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés.
<b>19</b>	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés, e o animal apresenta o rabo para baixo durante parte ou todo o tempo.
<b>20</b>	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés, e o animal apresenta consistente elevação do rabo e instabilidade do tronco.
<b>21</b>	Apoio plantar consistente e caminhada coordenada, movimento consistente dos dedos dos pés, posição da pata predominantemente paralela ao corpo durante todo o estágio de suporte; estabilidade consistente do tronco e elevação consistente do rabo.

(BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995)

	<b>DEFINIÇÕES</b>
<b>MODERADO</b>	Movimento parcial da articulação, abaixo da metade da amplitude de movimento da articulação.
<b>EXTENSO</b>	Movimento parcial da articulação, acima da metade da amplitude de movimento da articulação.
<b>MOVIMENTO DE PEDAL</b>	Movimento rítmico do membro posterior no qual as três articulações são estendidas, então totalmente flexionadas e estendidas mais uma vez. O animal geralmente se inclina para os lados, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, não há suporte de carga evidente em toda a superfície da pata traseira.
<b>SEM SUPORTE DE CARGA</b>	Na contração do músculo extensor dos membros posteriores durante apoio plantar da pata ou elevação da coxa.
<b>COM SUPORTE DE CARGA</b>	Contração do músculo extensor dos membros posteriores durante apoio plantar da pata ou sem elevação da coxa.
<b>APOIO PLANTAR</b>	A pata está em contato planar com suporte de carga, seguido de movimento de avanço do membro até que o contato plantar é restabelecido com suporte de carga.
<b>PASSO DORSAL</b>	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo de passo.
<b>COORDENAÇÃO DOS MEMBROS POSTERIOR-ANTERIOR</b>	Para cada passo do membro anterior um passo é dado com o membro posterior e o membro posterior oposto.
<b>OCASIONAL</b>	Menor ou igual a metade das vezes, < 50%
<b>FREQUENTE</b>	Mais do que a metade, mas nem sempre, 51- 94%
<b>CONSISTENTE</b>	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%
<b>INSTABILIDADE DE TRONCO</b>	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado ao outro ou colapso parcial do tronco.

(BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995)