



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Isadora Nicole Lara Piccinin

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Bidens pilosa*
Linn (PICÃO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Florianópolis

2020

Isadora Nicole Lara Piccinin

AVALIAÇÃO *in vitro* DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Bidens pilosa*
Linn (PICÃO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA

Dissertação/Tese submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Agroecossistemas da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de mestre em
Agroecossistemas

Orientador: Prof. Shirley Kuhnen, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Piccinin, Isadora Nicole Lara

AVALIAÇÃO in vitro DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Bidens pilosa* Linn (PICÃO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA / Isadora Nicole Lara Piccinin ; orientadora, Shirley Kuhnen, 2020.

57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Produtos Naturais. 3. Fitoquímica. 4. Citotoxicidade. 5. Atividade Antimicrobiana. I. Kuhnen, Shirley. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. III. Título.

Isadora Nicole Lara Piccinin

AVALIAÇÃO *in vitro* DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Bidens pilosa*
Linn (PICÃO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Acácio Zielinski, Dr.
Instituição UFSC

Prof^a. Daniele Kazama, Dra.
Instituição UFSC

Prof^a. Luciana Honorato, Dra.
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em agroecossistemas

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^a, Shirley Kuhnen, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2020

RESUMO

Na mastite bovina, doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, a aplicação de antimicrobianos é o tratamento preconizado. Entretanto, o uso indiscriminado tem consequências negativas ao meio ambiente e a saúde pública. Desta forma, é crescente a busca por métodos alternativos de controle, como pelos produtos naturais, os quais podem também ser utilizados por sistemas orgânicos que possuem restrições quanto à utilização de fármacos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial de extratos hidroalcoólicos de *Bidens pilosa*, reconhecidos por diversas atividades biológicas, no tratamento da mastite bovina. Para isso, buscou-se otimizar as condições de extração hidroalcoólica, i.e., tempo de extração (4 h, 48 h e 7 dias) através da determinação do perfil químico e das atividades antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade. Nos extratos preparados com 4 e 48 h (EB-4 e EB-48, respectivamente) os teores de fenólicos e flavonoides totais foram superiores ao encontrado no extrato obtido com 7 dias (EB-7). As atividades antioxidantes pelo método de captura do radical DDPH dos extratos EB-4, EB-48 e EB-7 foram 80%, 79% e 56%, respectivamente, estando fortemente correlacionadas ao teor de fenólicos e flavonoides totais (acima de 0,87%). A análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), após fracionamento utilizando a extração em fase sólida (EFS), revelou que os flavonóis eram o grupo majoritário para os extratos EB-4 e EB-48 e os ácidos fenólicos para EB-7. Apesar das diferenças encontradas no perfil químico, os três extratos mostraram atividade antimicrobiana similar, com uma concentração inibitória mínima (CIM) em torno de 0,3 mg/mL. A IC₅₀ no ensaio de citotoxicidade para o extrato EB-4 frente às células MAC-T foi 0,156 mg/mL, i.e., cerca da metade do valor da CIM. Além disso, o extrato EB-4 promoveu 100% da inibição da formação e erradicação de biofilme pré-formado na concentração de 2 mg/mL. Os resultados encontrados evidenciaram o potencial dos extratos de *B. pilosa*, uma espécie invasora de fácil disseminação, no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, principalmente devido a atividade antimicrobiana e antibiofilme. Entretanto, devido a toxicidade moderada, sugere-se a realização de novos estudos de incorporação do extrato em sistemas nanoemulsionados visando o desenvolvimento de um novo produto para o tratamento da mastite bovina, especialmente para os sistemas de produção sustentáveis, i.e., orgânico ou agroecológico.

Palavras-chave: Células MAC-T; Atividade antimicrobiana; Citotoxicidade; Biofilme; Fitoquímica.

ABSTRACT

In bovine mastitis, a disease characterized by inflammation of the mammary gland, the application of antimicrobials is the recommended treatment. However, the indiscriminate use has negative consequences for the environment and public health. Thus, the search for alternative methods of control is increasing, as well as natural products, which can also be used by organic systems that have restrictions on the use of drugs. Therefore, the present study aimed to evaluate in vitro the potential of *Bidens pilosa* hydroalcoholic extracts, recognized by several activities in the treatment of bovine mastitis. For this, we sought to optimize the hydroalcoholic extraction conditions, i.e., extraction time (4 h, 48 h and 7 days) by determining the chemical profile and antimicrobial activities, antibiofilm and cytotoxicity. In extracts prepared at 4 and 48 h (EB-4 and EB-48, respectively) the levels of total phenolics and flavonoids were higher to that found in the extract obtained after 7 days (EB-7). Antioxidant activities by the method of capturing the DDPH radical of the extracts EB-4, EB-48 and EB-7 were 80%, 79% and 56%, respectively, being strongly correlated to the total phenolics and flavonoids (above 0.87%). The analysis of extracts by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), after fractionation using solid phase extraction (EFS), revealed that flavonols were the majority group for extracts EB-4 and EB-48 and phenolic acids for EB-7. Despite the differences found in the chemical profile, the three extracts showed similar antimicrobial activity, with a minimal inhibitory concentration (MIC) around 0.3 mg / mL. The IC₅₀ in the cytotoxicity test for EB-4 extract against MAC-T cells was 0.156 mg / mL, i.e., about half of the MIC value. In addition, the EB-4 extract promoted 100% of the inhibition of formation and eradication of preformed biofilm at a concentration of 2 mg / mL. The results found showed the potential of *B. pilosa* extracts, an invasive species of easy dissemination, in the treatment of bovine mastitis caused by *S. aureus*, mainly due to antimicrobial activity and antibiofilm. However, due to moderate toxicity, it is suggested to perform new studies of incorporation of the extract in nanoemulsified systems aiming the development of a new product for the treatment of mastitis, especially for sustainable production systems, i.e., organic or agroecological.

Keywords: MAC-T cells; Antimicrobial activity; Cytotoxicity; Biofilm; Phytochemistry.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Conteúdo* de fenólicos e flavonoides totais (mg.g⁻¹) nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70. 35
- TABELA 2:** Determinação da atividade antioxidante* através do percentual e redução do radical DPPH dos extratos nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70. 37
- TABELA 3:** Correlação (R²) da % de inibição do radical DPPH com o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70. 37
- TABELA 4:** Percentual de contribuição relativa* das diferentes classes de compostos após fracionamento dos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* em fase sólida (SPE) após 4 h, 48 h e 7 dias de extração com etanol 70. 38
- TABELA 5:** Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM90) e Concentração Inibitória Mínima 50% (CIM50) (mg/mL) dos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70 frente a *S. aureus* ATCC 25923 e 9 isolados de leite mastítico..... 40
- TABELA 6:** Percentual de inibição da formação e da erradicação de biofilmes produzidos por *S. aureus* (ATCC25923 e 4 isolados de leite mastítico) após exposição a diferentes concentrações (mg/mL) do extrato bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4) de extração com etanol 70. 42
- TABELA 7:** Percentual de viabilidade* (%) das células da linhagem MAC-T após exposição a diferentes concentrações (mg/mL) do extrato bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4) de extração com etanol 70. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
Mastite Bovina.....	12
Tratamento da Mastite Bovina	14
Produtos Naturais	16
Bidens pilosa.....	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
ARTIGO.....	26
RESUMO.....	26
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
Coleta das Plantas	28
Preparação dos extratos	28
Determinação da matéria seca	28
Caracterização química dos extratos	28
Fenólicos Totais.....	28
Flavonoides Totais	29
Fracionamento por extração em fase sólida (EFS).....	29
Contribuição relativa das diferentes classes de compostos obtidas via EFS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	30
Atividade Antioxidante.....	30
Atividade Antimicrobiana.....	31
Atividade antibiofilme	32
Citotoxicidade.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
Caracterização química dos extratos	34
Atividade Antimicrobiana.....	39
Atividade antibiofilme	41
Citotoxicidade	44
CONCLUSÃO.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves sanitários da bovinocultura leiteira, tanto para os produtores quanto para a indústria, é a inflamação dos quartos mamários dos animais denominada de mastite. A presença desta doença nos rebanhos tem influência direta na qualidade e quantidade de leite produzido e descarte dos animais, além de prejudicar a transformação do leite em derivados pela indústria, em função de alterações na sua composição (MULLER, 2002).

Esta doença possui diversos agentes etiológicos como fungos, algas e, mais frequentemente, bactérias. Dentre essas, *Staphylococcus aureus* é a de maior ocorrência. As infecções causadas por esta espécie são conhecidas pelo seu rápido contágio e baixa taxa de cura em função da sua alta capacidade de aderência aos tecidos, podendo acarretar em infecções crônicas e de longa duração (DE SÁ et al., 2018).

A forma mais comum de controle desses microrganismos após a colonização da glândula é através da aplicação de antimicrobianos intramamários. No entanto, quando estes são utilizados de forma indiscriminada podem acarretar em diversos prejuízos como a presença de resíduos no leite comercializado ou no aparecimento de um quadro crescente de resistência bacteriana dentro dos rebanhos (LANGONI et al., 2017).

Existem relatos na literatura de isolados de leite mastítico resistentes aos princípios ativos mais utilizados na produção animal, como os β -lactâmicos (MENDONÇA et al., 2012). Estes estão relacionados com a maior parte das resistências encontradas em isolados produtores de biofilmes provenientes de leite mastítico (GOMES et al., 2016; MELO et al., 2012). Além disso, a presença de resíduos dessa classe de antimicrobiano no leite, consequência do não cumprimento do período de carência, ainda se mostrou altamente relacionada com a presença de *S. aureus* em amostras de leite cru (TEMPINI et al., 2018).

A capacidade de produção de biofilmes por isolados de *S. aureus*, na maior parte das vezes, está associada com quadros de resistência à metilicina, tornando ainda mais difícil seu controle e erradicação. A presença destes isolados também está ligada à mastite bovina e seu contágio em meio ao rebanho. Em um estudo recente, verificou-se que em amostras de leite proveniente de vacas com mastite subclínica (n=498), quase 15% delas

continham isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (SAMR) sendo que, desses, quase todos também apresentavam resistência a penicilina (100%), gentamicina (100%) e tetraciclina (98,6%) (YANG et al., 2020).

Diante do exposto, tem-se buscado alternativas no tratamento da mastite bovina, não apenas como substituição ao uso dos antimicrobianos convencionais, mas também para subsidiar as criações orgânicas e agroecológicas, que possuem restrições quanto ao uso de fármacos comerciais. Dentre essas, destaca-se o potencial das plantas nativas brasileiras como alternativa de tratamento e controle de doenças e parasitas em animais, como por exemplo, potencial anticarrapaticida, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, anticoccidiano, entre outros. Os extratos de plantas, por serem matrizes complexas, possuem efeito sinérgico, podendo conferir mecanismos de ação distintos, resultando em um menor quadro de resistência microbiana (LU et al., 2016).

A *Bidens pilosa*, também conhecida como picão preto, é uma planta invasora de lavouras que possui rápido desenvolvimento e alta produção e dissipação de sementes em condições tropicais. Essas características colaboraram para o seu processo de naturalização no Brasil, onde pode ser encontrada durante todo o ano (LORENZI, 2002). O uso tradicional e popular de *B. pilosa* inclui o tratamento de icterícia, cicatrização de feridas, diabetes, infecções de bexigas, como antimalárico, como anti-inflamatório, entre outros. A regulamentação do seu uso está presente no anexo I da RDC 10/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais (ANVISA, 2010). Neste caso, o uso das folhas na forma de infusão está descrito no tratamento de icterícia. Adicionalmente, estão descritas para *B. pilosa* diversas outras atividades *in vitro* como antimicrobiana, antimalárica, anti-histamínica, antioxidante, antileishmaniose, antibacteriana, anticarcinogênica, antidiabética, antifúngica, anti-helmíntica, anti-herpética, anti-inflamatória, antiparasitária, antipromastigota, antiviral, fotoprotetora, imunossupressora, imunomoduladora e de alteração da permeabilidade intestinal. Dentre os ensaios *in vivo* já foram testadas também as suas propriedades antiulcerogênica, gastroprotetora e antissecretora, analgésica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antimalárica, antitumoral, cicatrizante, diurética, hepatoprotetora e hipoglicemiante (BARTOLOME et al., 2013; BRANDÃO et al.,

1997; CHIANG et al., 2007; KVIECINSKI et al., 2011; NETO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2004; SHEN et al., 2018).

Devido ao potencial farmacológico de *B. pilosa* e a facilidade de cultivo e propagação da espécie, o presente estudo buscou avaliar o potencial *in vitro* de extratos hidroalcoólicos no tratamento da mastite bovina. Para isso, foram otimizadas as condições de preparo do extrato e investigadas as suas atividades antimicrobiana e antibiofilme contra *S. aureus* e os efeitos citotóxicos sobre células epiteliais mamárias bovinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Mastite Bovina

A inflamação da glândula mamária, denominada mastite, é uma doença que pode ser causada por dano mecânico, dano químico ou, mais frequentemente, por infecções microbiológicas, que acarretam em mudanças físicas e químicas no leite. Esta é uma doença que pode alastrar-se silenciosamente pelo rebanho, muitas vezes sem provocar alterações visíveis no leite e no animal (BARBALHO E MOTTA, 2001).

Em um levantamento realizado pela EMBRAPA (2019), mais de 80% dos produtores de leite entrevistados apontavam a mastite bovina como a principal doença responsável por perdas econômicas e com urgência de controle dentro dos rebanhos. Independentemente do grau de manifestação, esta doença pode interferir diretamente na qualidade e quantidade de leite produzido, impactando nos rendimentos do produtor e também no bem-estar dos animais (MCDUGALL et al., 2007).

A principal causa da doença é decorrente da entrada de microrganismos na glândula mamária, como algas, fungos e bactérias, sendo este o agente etiológico mais comum. As espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* são as mais frequentes (DE SÁ et al., 2018). Dentre essas, *S. aureus* é a de maior ocorrência nos rebanhos leiteiros, sendo o principal patógeno ligado às inflamações mamárias (DE SÁ et al., 2018). As infecções causadas por esta espécie estão associadas com a manifestação da mastite subclínica, sendo conhecidas pelo seu rápido contágio e baixa taxa de cura em função da sua alta capacidade de aderência aos tecidos, podendo acarretar em infecções crônicas e de longa duração (MCDUGALL et al., 2007; PYORALA, 2008). A capacidade de *S. aureus* aderir à superfície do epitélio é decorrente da secreção de uma matriz constituída por polímeros orgânicos, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que unem as células, denominada de biofilme. O mecanismo de formação dos biofilmes envolve quatro etapas: adesão da bactéria ao tecido, produção da matriz extracelular, formação das colônias e dispersão do biofilme (BASANISI et al., 2017; YANG et al., 2020).

A capacidade de formação de biofilmes, além de permitir a aderência e colonização do interior da glândula mamária, também dificulta a penetração de medicamentos e, portanto, o controle da doença (PYORALA, 2008). Em virtude disso, atualmente, a maior parte dos isolados produtores de biofilme são resistentes à antibióticos β -lactâmicos, como meticilina e penicilina, amplamente utilizados na produção animal, representando grave risco à saúde pública (MENDONÇA et al., 2012; YANG et al., 2020). Melo et al. (2012), por exemplo, verificaram que mais de 90% das cepas de *S. aureus* analisadas tinham a capacidade de aderir fortemente à placa e apresentavam os genes relacionados à formação de biofilmes, estando esses associados ao fator de virulência na patogenia da mastite em ruminantes.

A entrada e proliferação de microrganismos na glândula mamária pode ocorrer a partir da transmissão de um animal infectado para o outro, denominada mastite contagiosa, ou por microrganismos que estão no ambiente, denominada mastite ambiental. A primeira forma, está associada, muitas vezes, à manifestação subclínica da doença, que não apresenta sinais clínicos visíveis. Esta manifestação é responsável por 25% das perdas econômicas em sistemas de produção de leite, provocando alterações em sua composição. Devido ao difícil diagnóstico dos casos de mastite subclínica são necessários testes de rotina para a sua detecção, como o *California Mastitis Test* (CMT) (PERES NETO & ZAPPA, 2011).

Por outro lado, a mastite ambiental está mais presente na forma clínica, provocando alterações evidentes no leite, tais como a presença de grumos e odor característico, facilmente identificáveis pelo teste da caneca de fundo preto, além de alterações no úbere do animal, como edema, dor e sinais de inflamação (RIBEIRO et al. 2008). Diversos microrganismos encontrados no ambiente estão envolvidos na manifestação desta forma da doença, sendo altamente influenciada pela interação do animal com o ambiente e o agente patogênico. Em casos de mastite clínica, são descritas as espécies *Streptococcus disgalactiae* e *E. coli* como as principais bactérias responsáveis pela sua manifestação (BASKARAN et al., 2009; DE SÁ et al., 2018).

Tecidos afetados pela mastite bovina podem apresentar menor capacidade de síntese e secreção durante a lactação. Isso pode ocorrer em função da diminuição da área luminal e organelas relacionadas com a síntese e

secreção do leite causada pelos microrganismos, especialmente *S. aureus* (NICKERSON & AKERS, 1984).

A ocorrência da mastite bovina também está associada com a diminuição da eficiência reprodutiva, sendo que essa diminuição se torna mais severa em casos de mastite subclínica seguida de quadros clínicos (DALANEZI et al., 2019; SCHRICK et al., 2001). Além disso, a manifestação de casos de mastite clínica nos primeiros 100 dias da primeira lactação tem influência na taxa de incidência dessa doença no restante da vida produtiva do animal, ou seja, quanto maior a taxa nesses primeiros 100 dias, maiores serão as chances de reincidência nas lactações futuras (HERTL et al., 2018).

As ações comumente tomadas frente a mastite bovina, consistem na adoção de medidas profiláticas que tem por objetivo evitar o aparecimento de novos casos da doença em meio ao rebanho. Quando falhas no manejo sanitário e profilático ocorrem e a infecção se estabelece, o tratamento da mastite se faz necessário.

Tratamento da Mastite Bovina

A forma mais comum de tratamento da mastite bovina é por meio da utilização de agentes antimicrobianos, visando evitar a disseminação da doença para outros animais e quartos não infectados. Esta terapia é especialmente focada em casos clínicos, uma vez que os custos com o tratamento e descarte do leite durante o período de carência não justificam economicamente sua utilização em casos subclínicos (MCDOUGALL et al., 2007). O tratamento mais comum para quadros de mastite subclínica é a administração de antimicrobianos entre os intervalos de lactação, denominado de terapia da vaca seca. A eficiência desse tratamento está relacionada com o grau de infecção, o patógeno e o estado do animal. Vacas mais velhas, por exemplo, tendem a apresentar respostas mais lentas e menos intensas ao antimicrobiano utilizado (OLIVER & MURINDA et al., 2012; MCDOUGALL et al., 2007).

É importante lembrar que, para tratamentos convencionais, caso os microrganismos não sejam completamente eliminados, os remanescentes irão prosseguir com o processo de colonização da glândula mamária, enfatizando a necessidade de tratamentos eficientes para o controle desta doença nos rebanhos. Muitas vezes, por não se conhecer o patógeno ou a sua sensibilidade,

o produtor opta pela utilização de antimicrobianos de amplo espectro, o que nem sempre resulta em cura, uma vez que existem diversos outros aspectos biológicos envolvidos na sua erradicação (LANGONI et al., 2017; RIBEIRO, 2008).

Além disso, a antibioticoterapia comumente aplicada em períodos de lactação pode representar um risco à saúde humana quando utilizada de forma indiscriminada. No Brasil, por exemplo, existem poucas restrições, a exemplo da Instrução Normativa 26/2009 (BRASIL, 2009), quanto a comercialização, aquisição e aplicação de antibióticos para uso veterinário. Esta situação permite que o produtor adquira esses medicamentos livremente, podendo ser utilizados em dosagens e períodos inadequados e, algumas vezes, sem respeitar o período de carência estipulado pelo fabricante. Além disso, também tem sido observada alta taxa de administração de terapias combinadas, ou seja, a aplicação de mais de um tipo de agente antimicrobiano por vez (TOMAZI & SANTOS, 2020).

A ineficiência desse tipo de tratamento, muitas vezes, é consequência da utilização indiscriminada desses antimicrobianos, resultando na progressão de um perfil de resistência dos microrganismos aos princípios ativos mais comuns. Em isolados de *E. coli* provenientes de glândulas mamárias bovinas acometidas por casos de diferentes severidades de mastite, mais de 90% (n=114) mostraram-se resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo bacitracina, cloxacilina e lincomicina (GUERRA et al., 2020).

Em um estudo realizado na China, mais de 90% (n=88) dos isolados de *S. dysgalactiae*, provenientes de amostras de leite de vacas com mastite, expressaram resistência a mais de um dos oito antimicrobianos testados. Além disso, 32% desses isolados foram positivos para a presença de genes de resistência (ZHANG et al, 2018).

Mesmo que o período de carência seja respeitado no que diz respeito à comercialização do leite, a presença de antimicrobianos pode representar ainda um problema ambiental. Isto porque é prática comum nas propriedades realizar o descarte desse leite no ambiente ou servi-lo para os bezerros em fase de aleitamento. O fornecimento do leite de descarte, que na maioria das vezes contém resíduos significativos de antibióticos, além de poder provocar diarreia aos bezerros, comprometendo a sua microbiota intestinal, pode levar à um quadro de resistência dos microrganismos intestinais àqueles fármacos (RICCI

et al., 2017). Em um estudo realizado na Califórnia TEMPINI et al. (2018), por exemplo, observaram que 60% das amostras de leite cru destinado ao aleitamento de bezerras apresentavam resíduos de três classes de antibióticos acima do permitido, sendo 44% antibióticos β -lactâmicos. A presença desta classe de antibióticos no leite ainda se mostrou altamente relacionada com a presença de *S. aureus* nas amostras (TEMPINI et al., 2018).

Diante das consequências da utilização indiscriminada dos antimicrobianos comerciais, a busca por alternativas de tratamento para a mastite bovina tem se intensificado. O Brasil contém em sua extensão mais de um terço da flora mundial, conferindo ao país um potencial nicho de mercado que é a descoberta de novas plantas com potencial terapêutico (YUNES et al., 2001).

Produtos Naturais

O uso terapêutico das plantas está relacionado a presença de compostos químicos pertencentes ao metabolismo secundário vegetal. Tais metabólitos estão restritos a um número limitado de organismos, que embora não sejam essenciais, garantem vantagens para a sua sobrevivência e perpetuação em seu ecossistema (SIMÕES, 2016). Estes que foram durante muito tempo considerados como produtos da excreção vegetal, são atualmente reconhecidos por seu envolvimento nos mecanismos de adaptação ao meio onde a planta vive. Dentre as funções atribuídas aos metabólitos secundários estão: defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e alelopatia (SIMÕES, 2016).

Os principais grupos de metabólitos secundários encontrados em plantas são os compostos fenólicos, os terpenos e esteróides e os alcalóides (FUMAGALI et al, 2008). Os ácidos fenólicos são estruturas aromáticas sintetizadas a partir da fenilalanina e encontradas em abundância nas plantas, sendo reconhecidos pela sua atividade antioxidante. Dentre os compostos fenólicos de maior relevância para o presente trabalho, encontram-se os flavonoides. Estes são classificados em 14 grupos formados por um esqueleto de 15 carbonos, incluindo um anel aromático (B) que pode se encontrar na posição 2, 3 ou 4 (figura 1). Estes compostos possuem diversas atividades

biológicas, sendo especialmente reconhecidos por desempenharem atividade antioxidante (SEIGLER, 1998).

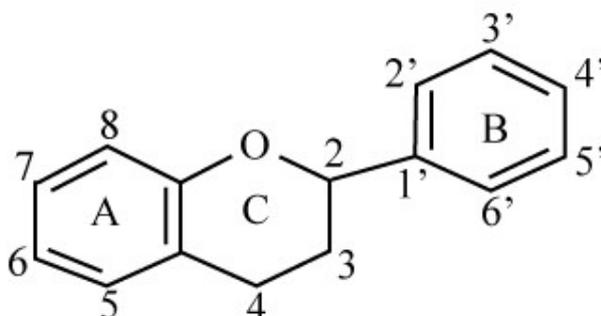


Figura 1: Estrutura básica de um flavonoide.

Dentre as diversas classes de flavonoides, estão as antocianinas (figura 2), importantes pigmentos responsáveis pelas cores vermelha, azul e violeta de flores e frutos. Estes compostos são especialmente acumulados nas plantas em resposta ao estresse ou ao ataque de patógenos, deficiência de minerais e estresse hídrico. A pigmentação desencadeada por esta classe é um fator importante na dispersão de frutos e pólen pelos animais, além de poder atuar, em alguns casos, na resistência à insetos (SEIGLER, 1998).

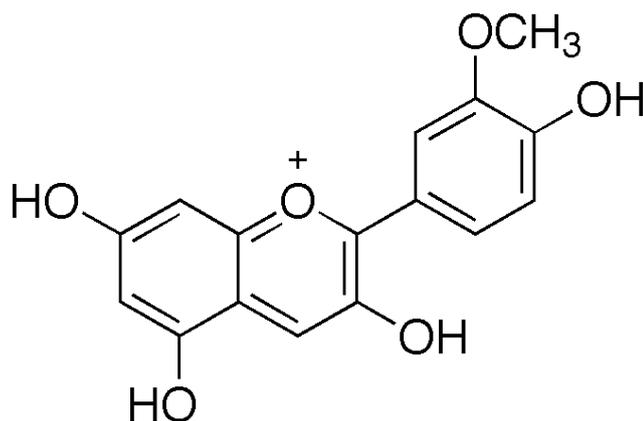


Figura 2: Estrutura da antocianina peonidina.

Finalmente, as proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são moléculas formadas por unidades de flavonoides, como

flavan-3-óis (catequina) e flavano-3,4-diol. Dentro desta classe encontramos as procianidinas (figura 3), compostos formados a partir de moléculas de catequina e epicatequina. Tais compostos são especialmente reconhecidos pela sua atividade biológica frente a patógenos e microrganismos (SEIGLER, 1998).

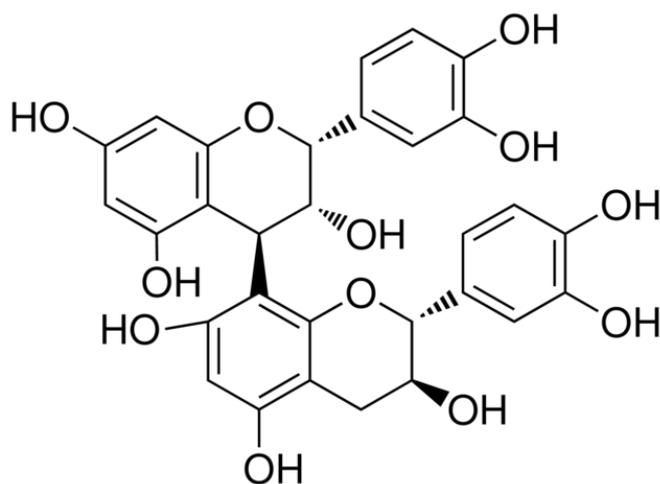


Figura 3: Procianidina B2.

O conhecimento popular sobre o uso das plantas no tratamento de doenças é uma prática, ainda hoje, amplamente difundida na sociedade (HUGES et al., 2019; MANYA et al., 2020). Este conhecimento vem sendo transmitido empiricamente de uma geração a outra desde a Antiguidade. Nos papiros de Ebers, no Egito, por exemplo, estavam catalogadas mais de 120 plantas medicinais. Já na Idade Média, os estudos com plantas medicinais foram brevemente esquecidos com a ascensão da igreja católica. Estes estudos foram retomados no século XIII, mas apenas no século XV foi realizada a impressão do primeiro livro relacionado ao cultivo de plantas medicinais. Após este período, diversos avanços no conhecimento acerca do potencial e formas de utilização dessas plantas foram obtidos (JUTE et al., 2017).

As plantas medicinais constituem o alicerce da medicina tradicional. Com o avanço da química, diversos compostos químicos foram isolados das plantas para fins terapêuticos. Dentre eles, destacam-se a salicina, presente na casca do salgueiro (*Salix alba*) a qual serviu para a síntese química do ácido acetilsalicílico (aspirina), o paclitaxel, extraído das cascas de *Taxus brevifolia* utilizado no tratamento de câncer, e a morfina, extraída das flores da papoula

(*Papaver somniferum*) e utilizada até hoje como um dos mais potentes analgésicos (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Através destes avanços e da obtenção de estratégias de obtenção de moléculas sintéticas, os estudos acerca do potencial e cultivo das plantas medicinais foi deixado de lado. Entretanto, de acordo com o surgimento da necessidade de novos compostos e ações sinérgicas entre compostos ativos, bem como com o objetivo de aprofundar conhecimentos acerca do funcionamento de compostos no organismo, tem sido observado um novo avanço na ciência que busca conhecer mais sobre as propriedades terapêuticas das plantas medicinais. Dentre os mais de 950 medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA, atualmente, 230 destes estão válidos (ANVISA, 2020). Isso demonstra a importância das plantas na terapia de enfermidades, especialmente considerando a dificuldade de mimetizar o sinergismo e a diversidade de moléculas existentes na natureza através da síntese química (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Além do uso em humanos, as plantas medicinais são também usadas na medicina veterinária, especialmente naquelas propriedades rurais em que não se tem fácil acesso aos medicamentos alopáticos. O uso na medicina veterinária inclui especialmente o controle de ectoparasitas (SINGH et al., 2016; WELLINGTON et al., 2017), endoparasitas (CENCI et al., 2007; BAHMANI et al., 2014), infecções (BASKARAN et al., 2009) e inflamações (LI et al., 2019). Muitas vezes a utilização de plantas na saúde de famílias rurais vem ao encontro com as informações descritas na literatura (REZENDE & COCCO, 2002; YUNES et al., 2011).

Além disso, é importante destacar que o tratamento à base de plantas pode subsidiar as criações orgânicas. Nesses sistemas, existem severas restrições na legislação quanto ao uso de medicamentos comerciais, incluindo antimicrobianos e outras substâncias sintéticas. Segundo a **IN 46/2011** (BRASIL, 2011) independente da frequência e da doença que o animal é acometido, são permitidas a administração de medicamentos alopáticos por, no máximo, duas vezes ao ano, sem poder comercializar o leite dos animais durante o tempo correspondente a duas vezes o período de carência estipulado na bula do medicamento ministrado, obedecendo o prazo mínimo de 96 horas. Caso seja necessária a aplicação de um número maior de tratamentos, o animal deve ser

retirado do sistema orgânico. Na IN46/2011 (BRASIL, 2011), consta a relação de medicamentos permitidos na prevenção e tratamento de enfermidades dos animais criados em sistema orgânico, estando entre eles os fitoterápicos.

O potencial das plantas medicinais está também relacionado ao fato destas serem matrizes complexas, podendo haver um sinergismo entre os seus componentes, os quais podem conferir mais de uma ação frente ao patógeno, dificultando, por exemplo, o desenvolvimento de resistência (LU et al., 2016) Os extratos de plantas das espécies *Artemisia vulgaris*, *Ageratina adnophora*, *Euterpe oleracea*, *Indigofera oblongifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Anacardium occidentale*, *Pimpinella anisum* e *Moringa estenopetala*, por exemplo, mostraram atividade antimicrobiana contra isolados de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos convencionais, sendo também capazes, em alguns casos, de inibir a formação de biofilmes (DKHIL et al., 2020; MANANDHAR et al., 2019; MANILAL et al., 2020; SILVA et al., 2007; SANTOS et al., 2018; ZAYED et al., 2020). Visto que a mastite representa um entrave mundial, outras plantas como *Eucalyptus globulus*, *Persicaria pensylvania*, *Brassica oleracea*, *Plectranthus ornatos*, *Lepidium virginicum*, *Commiphora leptophloeos* e *Juglans regia* foram estudadas e demonstraram o mesmo potencial, desta vez frente a microrganismos relacionados com a manifestação da mastite bovina, incluindo *S. aureus* (ALONSO et al., 2020; GOMES et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; SILVA et al., 2019)

É importante destacar que nos estudos de avaliação do potencial das plantas para o tratamento da mastite bovina os resultados obtidos são, na maioria das vezes, a partir de testes antimicrobianos *in vitro*. O uso desses modelos que substituem ou reduzem o número de animais é resultado da pressão de vários setores da sociedade para que o uso de animais na pesquisa e no ensino seja reduzido. No entanto, no caso da busca de novos produtos para a mastite bovina, é preciso incluir além de ensaios antimicrobianos, testes *in vitro* que avaliem os efeitos sobre os animais.

Neste sentido, o grupo de pesquisa do LABINAT (CCA/UFSC) tem se dedicado a padronização de metodologias *in vitro* com explantes da glândula mamária e células epiteliais mamárias bovinas que possam garantir maior eficácia e segurança para os modelos *in vivo* nos estudos de desenvolvimento de novos antimicrobianos para a mastite bovina. Fiodalisi et al. (2014), por

exemplo, padronizaram o uso de explantes da glândula mamária em testes *in vitro* para avaliar o efeito de extratos de própolis. Um outro modelo também com explantes mamários foi padronizado por Pinheiro Machado et al. (2020) para estudar a capacidade de permeação e retenção de compostos fenólicos do extrato de macela e nanoemulsionado em sistema de célula de Franz.

Além dos estudos com explantes, vários outros testes *in vitro* com células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T já foram realizados pelo grupo de pesquisa do LABINAT, incluindo a avaliação da citotoxicidade, tipo de morte celular e citoproteção de diferentes extratos de plantas. O uso das células MAC-T possui algumas vantagens em relação aos explantes, tais como, rápida replicação, homogeneidade e menor chance de contaminação em relação aos explantes (HUYNH et al., 1995). Estes ensaios, mesmo que não substituam os testes *in vivo* e *ex vivo* garantem a segurança e eficácia dos produtos em teste.

Bidens pilosa

Em meio a diversidade de plantas com potencial terapêutico, a espécie *Bidens pilosa* (figura 4), popularmente conhecida como “picão preto”, é uma planta invasora de lavouras. Esta espécie possui rápido desenvolvimento e alta produção e dissipação de sementes em condições tropicais, o que colaborou para o seu processo de naturalização no Brasil, onde pode ser encontrada durante todo o ano (LORENZI, 2002). Esta espécie é originária da África, mas devido ao clima propício ao seu desenvolvimento, já pode ser encontrada em grande parte da Ásia e América do Sul, incluindo toda a extensão do território brasileiro (LORENZI, 2002).



Figura 4: Inflorescência de *Bidens pilosa* (Fonte: Silva et al., 2011).

Tradicionalmente esta planta é utilizada na forma de chá a partir da infusão de suas folhas em água quente. Seu uso popular abrange o tratamento de icterícia, úlceras, infecções e inflamações (ANVISA, 2010). Diversos registros na literatura evidenciaram o potencial de extratos de *B. pilosa* na medicina, tais como antimalária (OLIVEIRA et al., 2004; BRANDÃO et al., 1997), antitumoral (KVICINSKI et al., 2011; SHEN et al., 2018), frente a infecções (NETO et al., 2018) e no combate à diabetes (CHIANG et al., 2007). Estão também descritos estudos *in vivo* de formulações e extratos contendo *B. pilosa* para o tratamento de mucosite oral induzida por quimio e radioterapias (FILHO et al., 2018), como anti-hiperglicemiante (HSU et al., 2008), na modulação da diferenciação das células T de pacientes diabéticos (CHIANG et al., 2007) e no combate a infecções causadas por *Candida albicans* em ratos (CHUNG et al., 2016). Devido as inúmeras atividades biológicas já descritas para os extratos de *B. pilosa*, recentemente esta planta foi incluída na RDC Nº10 de 2010, sendo indicada pela ANVISA para o tratamento de icterícias (ANVISA, 2010).

No que diz respeito a composição química, há uma grande variedade de compostos químicos já descritos nos extratos de *B. pilosa*, sendo os de maior ocorrência os pertencentes ao grupo dos flavonoides e dos poliacetilenos. Além das classes mencionadas, estão também descritos esteroides, terpenos,

hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, ácidos carboxílicos, derivados do ácido benzoico, aldeídos, cumarinas e outras classes de fenilpropanoides, porfirinas, substâncias nitrogenadas e sulfuradas (BARTOLOME et al., 2013; HU et al., 2018).

Dentre os acetilenos, o C13-acetileno destaca-se como o mais abundante nas folhas, caule e raiz. Além dele, também foram identificados 9 tipos de poliacetilenos glicosídeos (SILVA et al, 2011). Dentre os compostos fenólicos, uma fonte de derivados de ácidos cafeicoquinínicos e flavonoides glicosídeos já foram encontrados, tendo sido atribuído a eles forte ação antioxidante capazes de inibirem a produção de mediadores de inflamação em macrófagos (CHIANG et al., 2004).

Estudos prévios também demonstraram que diferentes partes da planta possuem composição química distinta (CHAVASCO et al., 2014). Os extratos das flores e folhas, por exemplo, possuem alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas, enquanto caule e raízes possuem apenas taninos e saponinas (CHAVASCO et al, 2014). Maiores conteúdos de flavonoides foram também encontrados nas folhas em comparação ao caule e raiz (CHAVASCO et al., 2014).

De maneira geral, os extratos de *B. pilosa* são também reconhecidos pelo seu potencial antimicrobiano, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas (BAIRWA et al., 2010; ROJAS et al, 2006; MATHUR et al., 2010; DEBA et al., 2008; SILVA et al, 2014; PANDA et al., 2020). No estudo realizado por CHAVASCO et al. (2014), os extratos das raízes e caule de *B. pilosa* não afetaram o crescimento de bactérias gram-negativas, diferente dos extratos das folhas e flores. O extrato hidroalcoólico de *B. pilosa* também mostrou atividade (CIM 51,7 mg/mL) contra cepas de *S. aureus* resistente a metilicina.

Dentre os estudos de atividade antimicrobiana, o realizado por Krummenauer et al. (2019) avaliaram o potencial dos extratos de *B. pilosa* frente a microrganismos causadores da mastite bovina. Segundo aqueles autores, o decocto mostrou atividade frente à isolados de *S. aureus* de leite mastítico. Entretanto, este não foi capaz de controlar o crescimento de *Corynebacterium bovis*.

Devido aos inúmeros usos populares, o potencial antimicrobiano previamente demonstrado e as características agronômicas de interesse, i.e.,

rápido cultivo e propagação, a bioprospecção da atividade dos extratos de *Bidens pilosa* no tratamento da mastite bovina se justifica, podendo representar uma alternativa ao uso dos antimicrobianos convencionais para os sistemas de produção sustentáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar através de ensaios *in vitro* o potencial do extrato hidroalcolico de *Bidens pilosa* no tratamento da mastite bovina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar os teores de fenólicos e flavonoides totais na parte aérea de *B. pilosa* utilizando diferentes tempos de extração (4 h, 48 h e 7 dias) hidroalcolica (etanol 70%, v/v);
2. Determinar a atividade antioxidante dos extratos de *B. pilosa*;
3. Caracterizar os extratos hidroalcolicos de *B. pilosa* após fracionamento utilizando o método de extração em fase sólida (EFS) com cartuchos C-18 via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
4. Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *B. pilosa* contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e isolados de leite mastítico;
5. Avaliar a citotoxicidade do extrato de *B. pilosa* sobre células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T;
6. Avaliar a atividade antibiofilme do extrato de *B. pilosa* quanto a capacidade de inibição da formação e da erradicação de biofilmes produzido por *S. aureus*.

ARTIGO

AVALIAÇÃO *in vitro* DE EXTRATOS HIDROALCOOLICOS DE *Bidens pilosa* (PICAO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial de *B. pilosa*, espécie invasora e de fácil disseminação, no desenvolvimento de alternativa sustentável para o tratamento da mastite bovina. Para isso, 3 extratos foram preparados usando diferentes tempos de extração (4 h, 48 h e 7 dias) com etanol 70% e foram determinadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme contra *S. aureus*, bem como a citotoxicidade sobre células epiteliais mamária bovina (MAC-T). Os extratos preparados com 4 h e 48 h (EB-4 e EB-48) tinham teores de fenólicos e flavonoides totais superiores ao extrato preparado com 7 dias (EB-7). As atividades antioxidantes para os extratos E-4, EB-48 e EB-7 foram 80,7%, 79,5% e 56,3%, respectivamente, estando fortemente correlacionados aos teores de fenólicos e flavonoides totais (acima de $R^2=0,8$). A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos após fracionamento utilizando a técnica de extração em fase sólida (EFS) revelou que os flavonóis eram o grupo majoritário para os extratos EB-4 e EB-48 e os ácidos fenólicos para o EB-7. Apesar das diferenças químicas encontradas, todos os extratos mostraram atividade antimicrobiana similar, com um valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,3 mg/mL. A IC50 no ensaio de citotoxicidade do EB-4 foi 0,156 mg/mL, cerca da metade do valor da CIM. O extrato EB-4 promoveu ainda 100% da inibição da formação e erradicação de biofilme pré-formado na concentração de 2 mg/mL. Os resultados encontrados evidenciaram o potencial dos extratos de *B. pilosa*, em particular o EB-4, no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, os quais poderão constituir uma alternativa sustentável para os sistemas orgânicos ou agroecológicos.

INTRODUÇÃO

A *Bidens pilosa* é uma planta invasora de lavouras, naturalizada e altamente presente em todo o território brasileiro devido a sua rápida dissipação e adaptação ao clima do país. Esta planta foi adicionada ao RDC 10/2010 da ANVISA, onde foi indicada para o tratamento de úlceras e icterícia (ANVISA, 2020). Popularmente, esta espécie vem sendo utilizada na forma de chás, que podem ser obtidos a partir de infusão e decocção de todas as suas partes,

incluindo a parte aérea, caule e raízes. É reconhecida por seu potencial antiinflamatório e antimicrobiano e no tratamento de lesões e de problemas gastrointestinais (BARTOLOME et al., 2013; NETO et al. 2018; RIBEIRO et al., 2017). Além disso, a ação citotóxica dessa espécie frente a diferentes tipos de células tumorais está relatada na literatura (KVIECINSKI et al., 2011; SHEN et al., 2018).

A diversidade de potencial terapêutico para esta espécie deve estar relacionada a sua ampla variedade de metabólitos secundários. Elevados conteúdos de fenólicos e poliacetilenos, por exemplo, nos extratos de *B. pilosa* têm sido relacionados com as atividades moduladoras das células T, hepatoproteção, atividade antimicrobiana e atividade antimalárica (CHIANG et al, 2007; OLIVEIRA et al., 2004; YANG et al., 2014; YUAN et al., 2008). Além desses, os esteroides, terpenos, hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, ácidos carboxílicos, derivados do ácido benzoico, aldeídos, cumarinas e outras classes de fenilpropanoides, porfirinas, substâncias nitrogenadas e sulfuradas foram também descritos para esta espécie (BARTOLOME et al., 2013; HU et al., 2018).

Diante do exposto, é possível que a utilização dos extratos dessa planta possa se estender também à medicina veterinária, no tratamento de enfermidades de animais. A mastite bovina, por exemplo, é uma doença infectocontagiosa, caracterizada pela inflamação das glândulas mamárias, que acomete rebanhos leiteiros por todo o mundo. Esta doença causa grandes perdas econômicas em função do rápido contágio, altos custos com tratamento e dificuldade de diagnóstico (PERES NETO & ZAPPA, 2011; ROESCH et al., 2007).

Estudos prévios já demonstraram o potencial antimicrobiano dos extratos de *B. pilosa* frente bactérias gram-positivas e gram-negativas (BAIRWA et al., 2010; ROJAS et al, 2006; MATHUR et al., 2010; DEBA et al., 2008; SILVA et al, 2014; PANDA et al., 2020; KULSOOM et al., 2015), incluindo microrganismos causadores da mastite bovina (Krummenauer et al., 2019).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica dos extratos de *B. pilosa*, visando o seu uso no tratamento da mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Plantas

As plantas de *B. pilosa* foram coletadas em março de 2019 na área de lavoura da Fazenda Experimental da Ressacada (27° 41' 06.28" S; 48°32' 38.81" O) (UFSC) em período entre cultivos de milho. Conforme a lei nº 13.123/2015, cadastrada no Sistema Nacional De Gestão Do Patrimônio Genético (SisGen) sob o registro A29CCC6 (anexo 1). No laboratório, a parte aérea foi separada manualmente e o excesso de terra e sujidades foram retirados com água corrente. As plantas foram então secas em estufa de circulação forçada de ar (45°C) até peso constante. Posteriormente, o material vegetal foi triturado em moedor de grãos (Hamilton Beach, modelo 150W) até a obtenção de um pó fino e então armazenado a -80°C para posterior análise.

Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados através da adição de etanol 70% (v/v) à amostra (1:100 m/v), seguido de agitação constante por 4 h, 48 h e 7 dias à temperatura ambiente. Os extratos extraídos durante 7 dias foram mantidos em banho maria tipo Dubnoff (SOLAB) à temperatura ambiente. Posteriormente, o solvente orgânico foi totalmente removido em evaporador rotativo à 50°C, para a obtenção do extrato bruto (EB). A fase aquosa dos EB foram armazenados à -80°C e utilizados nos ensaios subsequentes.

Determinação da matéria seca

Para a determinação do teor de matéria seca, os extratos foram secos em estufa de circulação forçada de ar (60°C). Após 2 h em dessecador, as amostras foram pesadas e retornaram à estufa. Este procedimento foi repetido até que as amostras atingissem peso constante. As avaliações foram realizadas em triplicatas.

Caracterização química dos extratos

Fenólicos Totais

A determinação dos teores de fenólicos totais foi realizada utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). Brevemente, foram

acrescidos 300 μ L da amostra diluída (1:10, v/v) em 1,5 mL do reagente Folin Ciocalteu diluído (1:10, v/v) e 1,2 mL de Na_2CO_3 (7%, m/v). As amostras foram então mantidas ao abrigo da luz por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os valores de absorvância foram determinados em espectrofotômetro à 765 nm. A concentração foi calculada através da equação da reta obtida com a curva padrão de ácido gálico ($y=0,0169x$; $r^2=0,9918$).

Flavonoides Totais

A determinação dos teores de flavonoides totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Popova et al. (2004). Para isso, foram acrescidos 500 μ L da amostra diluída (1:10, v/v) em 500 μ L de AlCl_3 (2% em metanol) e 2,5 mL de EtOH. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os valores de absorvância foram determinados à 425 nm. A concentração foi calculada através da equação da reta obtida com a curva padrão de quercetina ($y=0,0104x$; $r^2=0,9971$).

Fracionamento por extração em fase sólida (EFS)

O fracionamento dos extratos para a caracterização das principais classes de compostos fenólicos foi realizada com cartuchos C18 (Sep-Pak®), conforme metodologia descrita por Jaworski & Lee (1987) e Oszmianski et al. (1988). Os EB tiveram seu pH ajustado para neutro (pH 7,0) com NaOH 5N e 0,5 mL foram passados através de cartuchos pré-condicionados neutros com água pH 7 (cartucho 1). Neste, compostos como os ácidos fenólicos não foram fixados e, após lavagem do cartucho com água (pH 7,0) houve a sua eluição. Após, o pH desta amostra foi diminuído para 2,0 com HCl 0,1 N e passada em um segundo cartucho pré-condicionado com água pH 2 (cartucho 2), obtendo-se a primeira fração. O cartucho 1 foi eluído novamente com 2,5 mL de acetonitrila 16% em pH 2,0, obtendo-se assim a segunda fração. Em seguida o cartucho 2 foi eluído novamente com 10 mL de acetato de etila para obtenção da terceira fração. Finalmente, o mesmo cartucho foi ainda eluído com 2,5 mL de metanol para obtenção da quarta fração. A fase orgânica de todas as frações foi evaporada com N_2 gasoso e, os resíduos ressuspensos em 1 mL de metanol. As frações

(F1, F2, F3 e F4) foram analisadas via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os fracionamentos foram realizados em duplicatas.

Contribuição relativa das diferentes classes de compostos obtidas via EFS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise das frações foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System), utilizando-se uma coluna C18 (4,6 x 250 mm; 5µm; 120 Å) (Acclaim™120, Thermo Scientific®). A fase móvel consistiu de água Milli-Q acidificada com 1% de ácido acético (A) e metanol (B). A eluição foi realizada em um fluxo de 1,0 mL/min, utilizando-se o seguinte gradiente: 0-5 min, 90% A; 5-25 min, 30% A; 25-37 min, 90% A. A detecção dos compostos de interesse foi realizada em detector UV-Vis em 240, 260, 280 e 320 nm. Para a identificação da representatividade de cada fração, realizou-se o somatório das áreas obtidas à 280 nm. A quantificação foi realizada através de uma curva padrão externa de ácido gálico para a fração 1, epigallocatequina para a fração 2, e quercetina para as frações 3 e 4. Para cada duplicata das frações, foram realizadas duas injeções, totalizando 4 injeções por fração.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Brevemente, foram acrescentados 200 µL da amostra em 2800 µL de DPPH. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 30 min, para posterior leitura em espectrofotômetro à 510 nm. A fórmula utilizada para a quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi:

$$\%ANTIOXIDANTE = (((ABS_{amostra} - ABS_{controle}) / ABS_{amostra}) * 100)$$

Onde, ABS_{amostra} corresponde à absorbância da amostra e ABS_{controle} corresponde à absorbância do controle (água).

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MH) seguindo a Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2016). Para isso, diferentes concentrações (50% a 0,4%, v/v) dos extratos foram testados frente a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e nove isolados de leite mastítico obtidos na bacterioteca do LABINAT (UFSC). O teste consistiu na adição de 100 µL de diluições seriadas dos extratos à 100 µL de caldo Mueller Hinton (MH) e 10 µL da suspensão bacteriana contendo 5×10^5 UFC/mL. A densidade da suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro à 620 nm para 5×10^8 UFC/mL e posteriormente diluída para a densidade utilizada no teste. Além das diferentes concentrações dos extratos, o ensaio incluiu dois controles, sendo um deles o controle positivo (caldo MH acrescido do inóculo) e um negativo, contendo as diferentes concentrações dos extratos em caldo MH, sem o inóculo. As microplacas foram então incubadas à 37°C por 24 h. Após a incubação, o valor das absorbâncias dos poços das microplacas foi determinado à 625 nm em espectrofotômetro (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) para cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano. Para isso, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\%ICB = (1 - ((\text{absTRAT} - \text{absCN}) / \text{absCP})) * 100$$

Onde, absTRAT corresponde à absorbância do tratamento, absCN corresponde à absorbância do Controle Negativo e absCP corresponde à absorbância do Controle Positivo. Após a leitura das microplacas, 50 µL do revelador resazurina (100 µg/mL) foram adicionados aos poços para a confirmação visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após a adição do revelador, as microplacas foram novamente incubadas à 37°C por 60 min. Com o uso deste revelador, a ausência de crescimento bacteriano é detectada pela cor azul e a presença de crescimento pela cor rosa. A mudança de cor do meio é resultado da atividade metabólica das células viáveis, com a oxirredução da resazurina em resorufina. O resultado das leituras no espectrofotômetro e da resazurina foram comparados.

Atividade antibiofilme

Em função dos resultados obtidos nos ensaios anteriores, o extrato EB-4 foi selecionado para os ensaios biológicos seguintes. O potencial do EB-4 em inibir a formação de biofilme e erradicar biofilme pré-formado foi determinado utilizando-se a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2007) com modificações. Inicialmente, 3 a 5 colônias de *S. aureus* foram incubadas em 5 mL de caldo TSB (suplementado com 1% de glicose) em estufa à 35°C, por 24 h. Foram utilizados nesse ensaio a cepa padrão ATCC 25923 e 4 isolados de leite mastítico formadores moderados de biofilme conforme determinado por Pinheiro Machado (2020).

Para o ensaio de inibição da formação de biofilme, a cultura bacteriana foi padronizada a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em meio TSB e transferida para placas de 96 poços (100 uL/poço) juntamente com diferentes concentrações do EB-4 (50% a 0,4%, v/v) (100uL/poço) por 48 h. Após este período, as microplacas foram lavadas com PBS (pH 7,4) por 3 vezes e secas em estufa de ventilação forçada de ar (60°C). Posteriormente, 200 uL de metanol foram adicionados a cada um dos poços e as microplacas incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Após secagem em estufa (60°C), foi realizada a adição do cristal violeta (2%, v/v) a cada um dos poços, seguido de incubação por 20 min. Para a remoção do excesso de corante, as microplacas foram novamente lavadas com PBS, seguido de secagem e adição do ácido acético 33% (200 uL). Os valores de absorbâncias foram determinados em espectrofotômetro de microplacas (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) à 570 nm, para posterior cálculo da porcentagem de inibição na formação de biofilme.

Para a realização do ensaio de erradicação de biofilme pré-formado foi realizada a incubação da suspensão bacteriana em microplaca de 96 poços (100 uL/poço) durante 24 h para a formação do biofilme. Após este período, o meio foi substituído por um novo, contendo as diferentes concentrações do extrato EB-4 (50% a 0,4%, v/v) e incubado em estufa por mais 48 h à 35°C. Posteriormente, procedeu-se com a lavagem, coloração e leitura conforme descrito acima para o ensaio de inibição da formação de biofilme. Todos os ensaios possuíam dois controles negativo (caldo TSB e caldo TSB + extrato) e um controle positivo (caldo TSB + inóculo) que passaram pelo mesmo processo.

Para o cálculo da porcentagem de inibição e erradicação do biofilme, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\%IB = \left(\frac{1 - (\text{absTRAT} - \text{absCP})}{\text{absCN} - \text{absCP}} \right) * 100$$

Onde, absTRAT corresponde à absorvância do tratamento, absCN corresponde à absorvância do Controle Negativo e absCP corresponde à absorvância do Controle Positivo.

Além da determinação do potencial antibiofilme do extrato usando o corante cristal violeta, para os dois testes determinou-se ainda em outras microplacas, a atividade metabólica existente através da adição do revelador resazurina. Para isso, após os períodos de incubação com as diferentes concentrações do extrato, o meio foi retirado e 100 uL de água estéril e 50 uL do revelador resazurina foram adicionados, seguido de incubação por 60 min (35°C). Após esse período, foi realizada a observação visual da mudança de cor dos poços conforme mencionado anteriormente. As microplacas foram então incubadas em banho de ultrassom (Ultronic USC-1600, 40 kHz) por 5 min e o conteúdo dos poços que permaneceram azuis, e as concentrações acima, foi semeado em placas de petri contendo meio BHI (*brain and heart infusion*). As placas foram então incubadas por 24 h à 35°C. Após esse período determinou-se o número de colônias.

Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do EB-4 foi realizada utilizando células epiteliais da glândula mamária bovina de linhagem MAC-T através do método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para isso, as células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB/ GIBCO), 4,5 g/L de glucose (Sigma Aldrich), 1 mM piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Vetec), 5 µg/mL de insulina (Himulin® Lilly) e 1 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich) mantidas por, pelo menos, 48 h à 37°C com atmosfera modificada contendo 5% de CO₂. Ao atingirem ao menos 70% de confluência, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços a uma densidade de 100.000 células/poço. Aproximadamente 24 h após o plaqueamento, o meio de

cultura contendo as células já aderidas à placa foi substituído pelo meio acrescido das diferentes concentrações do extrato (10% a 0,03%, v/v). Após 24 h à 37°C em atmosfera modificada contendo 5% de CO₂, foi realizada a adição do MTT (0,5 mg/mL) seguido de nova incubação por 2,5 h e posterior dissolução dos cristais com DMSO (100 µL). Neste ensaio, foi realizada a quantificação da metabolização do MTT presente no meio pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, formando cristais de formazan (cristais de cor azul). Assim, a quantidade de formazan foi determinada em espectrofotômetro de microplacas à 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. O controle (i.e. meio fresco sem o extrato) foi considerado como 100% de células viáveis. O experimento foi realizado em triplicata.

Análise Estatística

Os resultados dos conteúdos de fenólicos e flavonóides totais, atividade antioxidante e do fracionamento por EFS foram analisados através do teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey para a separação de médias ($p > 0,05$). Além disso, foi determinada a correlação dos conteúdos de fenólicos e flavonoides totais com a atividade antioxidante através de regressão linear. A IC₅₀ da avaliação da citotoxicidade foi determinada através de teste de regressão não linear. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química dos extratos

O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais foi significativamente maior nos EB-4 e EB-48 do que no EB-7 (tabela 1). Para todos os extratos, cerca da metade do conteúdo de fenólicos foi representada pelos flavonoides. No EB-7, os menores conteúdos encontrados devem-se provavelmente a degradação dos compostos em função do maior tempo de extração utilizado. Isso pode ocorrer em função da rápida degradação dos metabólitos secundários na presença de luz, oxigênio e temperaturas elevadas, o que pode interferir no seu potencial biológico (SIMÕES et al., 2016).

TABELA 1: Conteúdo* de fenólicos e flavonoides totais (mg.g-1) nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70% (v/v).

Classes de compostos	EB-4	EB-48	EB-7
Fenólicos	21,45±1,4 ^A	19,07±1,4 ^A	15,98±0,6 ^B
Flavonóides	12,75±1,03 ^A	10,65±0,7 ^A	8,3±0,4 ^B

. * Média de três extrações independentes ± desvio padrão. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre os extratos.

Os teores e a composição fenólica nos extratos de *B. pilosa* tem sido determinados por diferentes autores (ADEPAPO et al., 2011; CHIPUPURA et al., 2009; DEBA et al., 2007; KVICINSKI et al., 2011; LEE et al., 2013; WU et al., 2012). No decocto do caule, folhas e raízes DEBA et al. (2007) encontraram 76,1, 47,6 e 30,7 mg EAG/g de fenólicos totais. Já WU et al. (2012), encontraram conteúdos superiores aos do presente estudo, cerca de 95,29 mg EAG/g nos extratos etanólicos (75:25, v:v) obtidos com a planta inteira. Tais variações demonstram que o método de extração, solvente extrator, tempo de extração assim como a origem das plantas são fatores determinantes para obtenção de extratos com perfis químicos de interesse. Nesse sentido, estudos visando a produção de extratos vegetais padronizados são importantes para garantir a sua eficácia. De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 18 DE JUNHO DE 2014, para que seja realizado o registro de fitoterápicos na ANVISA, se faz necessária a padronização de compostos através de padrão de referência ou método válido que inclua a curva de calibração realizada na mesma data e condições da amostra avaliada, incluindo perfil cromatográfico (ANVISA, 2020).

No mercado há uma série de extratos padronizados disponíveis com base no teor de fenólicos ou flavonoides totais, a exemplo de *Crataegus oxyacantha* e *Ginkgo biloba* (ANVISA, 2013). No caso de produtos formulados com extratos de *B. pilosa* seria também importante garantir níveis de fenólicos e flavonoides totais, objetivando assegurar a atividade biológica do produto, incluindo a atividade antimicrobiana. Para isso, são necessários a realização de novos estudos, ampliando os resultados aqui obtidos.

No presente estudo, a atividade antioxidante (tabela 2) foi similar entre os extratos EB-4 e EB-48, tendo sido superior à do extrato EB-7. A menor atividade antioxidante do EB-7 está de acordo com os resultados encontrados para os teores de fenólicos totais. Tal resultado corrobora com a hipótese de ter havido a degradação de parte dos compostos neste extrato em função do maior tempo despendido no processo extrativo. A atividade antioxidante promissora dos extratos, frações e compostos isolados de *B. pilosa* foi descrita previamente por outros autores (CHIANG et al., 2004; DEBA et al., 2008; WU et al., 2013; CHIPUPURA et al., 2009).

Uma alta correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais foi encontrada para todos os extratos (tabela 3). Desse modo, pode-se sugerir que, o potencial antioxidante dos extratos está relacionado à presença destes compostos. De maneira geral, existe correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos dos extratos de *B. pilosa* e atividade antioxidante. WU et al. (2012), por exemplo, encontraram uma correlação de 0,9707. Já CHIPURURA et al. encontraram fraca correlação ($R^2=0,49$) entre o teor destes compostos e a captura do radical DPPH dos extratos metanólicos dessa espécie. Chiang et al. (2004) atribuíram a atividade antioxidante de *B. pilosa* a presença dos fenólicos quercetina-3-O-rabinobiosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, ácido clorogênico, ácido-4,5-di-O-cafeoilquinico e ácido-3,4-di-O-cafeoilquinico, os quais foram submetidos a testes de fração de uso com álcool butílico. Dentre os fenólicos, quercetina-3-O-rabinobiosídeo foi encontrada como o composto majoritário.

É importante destacar que no contexto da mastite bovina, para além da atividade antimicrobiana, poderia ser de interesse um produto com ação antioxidante. Extratos com potencial antioxidante são altamente relevantes na prevenção e tratamento de diversas doenças, pois podem atuar na inibição de espécies reativas do oxigênio (ERO) que desencadeiam a liberação de citocinas, as quais iniciam o processo inflamatório, por exemplo. Wei et al. (2015), identificou que o magnolol, isolado do caule da *Magnolia sp.*, causou inibição da resposta inflamatória através da diminuição da produção de citocinas em modelos *in vitro* com células mamárias e *in vivo* com ratas após exposição ao LPS.

TABELA 2: Determinação da atividade antioxidante* através do percentual de redução do radical DPPH dos extratos nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70% (v/v).

	EB-4	EB-48	EB-7
% de inibição do radical DPPH	80,7±0,8 ^A	79,5±1,4 ^A	56,3±1,8 ^B

* Média de três extrações independentes ± desvio padrão. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre os extratos

TABELA 3: Correlação (R^2) da porcentagem de inibição do radical DPPH com o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70% (v/v).

Classes de compostos	EB-4	EB-48	EB-7
FENÓLICOS	0,9329	0,9862	0,8749
FLAVONOIDES	0,8683	0,9398	0,9692

Posteriormente aos testes quantitativos, procedeu-se com o fracionamento dos extratos utilizando-se a técnica de EFS com o objetivo de diferenciar os extratos quanto as classes de compostos fenólicos. Este método baseia-se na separação de analitos de uma matriz complexa a partir da sua eluição em uma fase sólida e tem sido amplamente empregado no estudo de extratos de plantas (JAWORSKI & LEE, 1987; OSZMIANSKI et al., 1988). No presente estudo, as frações obtidas por esta técnica foram analisadas por CLAE (Tabela 4). Nos extratos EB-4 e EB-48, a fração 3 representou mais de 50% do total da área do cromatograma. Por outro lado, no extrato EB-7 a fração mais representativa foi a fração 1 (cerca de 53% da área do cromatograma). Devido a polaridade dos solventes utilizados no fracionamento e com base na composição química descrita previamente para esta espécie (CHIANG et al., 2004; KVIECINSKI et al. 2011) sugere-se que a Fração 1 corresponde aos ácidos fenólicos e a Fração 3 aos flavonóis dos extratos. Dessa forma, verificou-se um perfil químico distinto do extrato EB-7 em relação aos demais, o qual deve

ser decorrente do maior tempo de extração utilizado e de possíveis reações de oxidação após o processo extrativo. É importante destacar que o maior conteúdo de flavonóis nos extratos EB-4 e EB-48 conferiu maior atividade antioxidante aos mesmos, sugerindo um maior potencial aos mesmos.

Diversos estudos com *B. pilosa* tem mostrado que os flavonóis juntamente com os poliacetilenos são os compostos majoritários nos extratos dessa espécie. A presença de tais compostos tem sido observada principalmente na parte aérea da planta (BRANDÃO et al., 1997; KVIESCINSK et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004; WANG et al., 1997). Enquanto no estudo de Chavasco et al. (2014), folhas e flores, possuíam alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas, os galhos e raízes eram majoritariamente constituídos por taninos e saponinas. Oliveira et al. (2004) identificaram nos extratos hidroalcoólicos das raízes desta espécie a quercetina-3,3'-dimetoxi-7-O-ramnoglucopiranose como o composto fenólico majoritário. No entanto, diversos outros compostos já foram encontrados, incluindo ácido quinínico, alguns ácidos monocafeicoquinínicos, catequinas, quercetinas, kaempferol, vanilina, ácido protocateico, ácido gálico e ácido ferúlico (SINGH et al., 2017; MOYO et al., 2020; CHIPURURA et al., 200).

Cabe destacar que, no presente estudo, embora tenham sido empregados na CLAE vários padrões comerciais de compostos fenólicos, não foi possível a identificação de nenhum deles nas amostras em estudo. Esse resultado pode sugerir um perfil químico particular para as amostras, o qual pode ser resultado de reações de glicosilação e metilação dos compostos fenólicos, tornando inviável a sua identificação pela técnica empregada, i.e., CLAE. Além disso, é importante destacar que o perfil de metabólitos secundários pode variar em função de fatores externos e de como a planta reage a eles, como local de origem, clima, temperatura e nutrientes presentes no solo (SEIGLER, 1998).

TABELA 4: Percentual de contribuição relativa* das diferentes classes de compostos após fracionamento dos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* em fase sólida (EFS) após 4 h, 48 h e 7 dias de extração com etanol 70%.

Classes de compostos	EB-4	EB-48	EB-7
Fração 1	26,5%±2,2 ^B	17,4%±1,8 ^B	52,6%±3,5 ^A
Fração 2	3,0%±0,5 ^A	1,5%±0,03 ^A	2,6%±0,4 ^A

Fração 3	59,4%±3,3 ^A	54,9%±10,5 ^A	38,2%±2,1 ^B
Fração 4	11,1%±1,7 ^B	26,2%±11,9 ^A	6,6%±1,5 ^B

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre os extratos para 4 injeções (n=2).
 * Média ± desvio padrão de dois fracionamentos independentes e três injeções no cromatógrafo.

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos em estudo foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM90) e Concentração Inibitória Mínima 50% (CIM50). A CIM é a menor concentração de um antimicrobiano que inibe pelo menos 80% do crescimento de um microrganismo (CLSI, 2016), e as CIM50 e CIM90 representam, respectivamente, a CIM em que 50% e 90% dos isolados testados tem seu crescimento inibido (tabela 5) (SCHWARTZ et al., 2010). No presente estudo, todos os extratos analisados inibiram o crescimento de *S. aureus*, com uma CIM de cerca de 0,3 mg/mL. Tais resultados demonstraram o potencial antimicrobiano do extrato de *B. pilosa*, o qual pode ser classificado como moderado a forte dependendo do autor. Na classificação proposta por Aligiannis et al. (2001) e por Sartoratto et al. (2004), por exemplo, o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais é considerado forte, moderado e fraco quando a CIM está abaixo de 0,5 mg/mL, entre 0,6 e 1,5 mg/mL e acima de 1,5 mg/mL, respectivamente. Já na classificação sugerida por Holetz et al. (2002), o potencial antimicrobiano moderado é considerado entre 0,1 e 0,5 mg/mL.

A bioatividade dos extratos em estudo já havia sido demonstrada no ensaio de atividade antioxidante (tabela 3), a qual esteve fortemente correlacionada com os teores de fenólicos e flavonoides totais dos extratos (tabela 1). Conforme observado por Gomes et al. (2018), a presença destes compostos nos extratos vegetais contribui com a atividade antimicrobiana.

Além disso, enquanto para os extratos EB-4 e EB-48 não houve diferença entre as CIMs, para o extrato EB-7, a CIM foi superior às CIM90 e CIM50 (tabela 5). Estes resultados foram confirmados visualmente com a adição do corante resazurina (dados não mostrados).

TABELA 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM90) e Concentração Inibitória Mínima 50% (CIM50) (mg/mL) dos extratos bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4), 48 h (EB-48) e 7 dias (EB-7) de extração com etanol 70% frente a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e 9 isolados de leite mastítico.

Atividade antimicrobiana	EB-4	EB-48	EB-7
CIM (mg/mL)	0,3	0,3	0,3
CIM90 (mg/mL)	0,3	0,3	0,15
CIM50 (mg/mL)	0,3	0,3	0,15

É importante destacar que a CIM encontrada no presente estudo é bem inferior à de estudos prévios (RABE & STADEN, 1997; DS. CHIAVARI-FREDERICO et al., 2019), que também utilizaram a metodologia de microdiluição em caldo. Em um outro estudo foi encontrada para os extratos metanólicos das raízes de *B. pilosa* uma CIM entre 5 a 10 mg/mL frente a bactérias GRAM positivas e negativas, incluindo *S. aureus* (ASHAFA & AFOLAYAN, 2009). Tais diferenças podem ser atribuídas à diferentes fatores, incluindo o tipo de solvente extrator, condições de cultivo, estágio fenológico, condições climáticas, entre outros.

É importante destacar que, mesmo que a escolha tecnológica do EB-4 seja feita em função do menor tempo de extração, a informação de que o efeito antimicrobiano não diminui, mesmo após 7 dias de extração, é relevante para a produção do extrato à campo. Isso ocorre por conta da necessidade do produtor em obter um extrato com durabilidade, diminuindo a necessidade de extrações frequentes e aumentando a sua aceitabilidade em utilizar um produto natural.

De fato, a CIM pode variar de acordo com a parte da planta utilizada na preparação do extrato. Para *B. pilosa* foi encontrada uma maior susceptibilidade de *S. aureus* aos extratos das flores (CIM= 1,56 mg/mL) comparado aos extratos de raízes, caule e folhas (CHAVASCO et al., 2014). Os autores verificaram também que o extrato das raízes não possuía potencial para inibir o crescimento microbiano e que o extrato das flores e das folhas mostraram atividade contra

bactérias GRAM negativas. A maior atividade encontrada nos extratos das flores e folhas foi atribuída pelos autores à presença dos flavonoides (CHAVASCO et al., 2014; YUAN et al., 2008). Diferentemente, no presente estudo, a despeito das diferenças de perfil químico entre os extratos, as CIMs foram muito similares, variando de aproximadamente 0,15 a 0,3 mg/mL. Desse modo, pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana não deve ser decorrente do maior conteúdo de flavonóis encontrado nas amostras EB-4 e EB-48, comparado ao EB-7 (Tabelas 1 e 5), podendo estar relacionada a presença de compostos químicos específicos. O potencial antimicrobiano de *B. pilosa* também já foi atribuído a presença dos poliacetilenos (KVIESCINSK et al., 2011). Estes compostos, quando testados de forma isolada, mostraram efeito frente a bactérias GRAM negativas e GRAM positivas, incluindo isolados de *S. aureus* metilicina resistente, em concentrações inferiores à apresentada por antimicrobianos convencionas (FUKUYAMA et al., 2012; GUO et al., 2017; TOBINAGA et al., 2009).

No presente estudo, os poliacetilenos não foram identificados ou quantificados em decorrência da falta de padrões comerciais. Apesar desses serem mais abundantes nas raízes de *B. pilosa*, não pode-se descartar que a atividade antimicrobiana possa estar relacionada a sua presença ou a de outras classes de compostos. Cabe destacar que os extratos de *B. pilosa* são matrizes bastante complexas, já tendo sido relatada a presença de cerca de 200 metabólitos secundários diferentes (BARTOLOME et al., 2013; WANG et al., 2010).

Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme foi determinada para o extrato EB-4, extrato selecionado para a realização dos demais ensaios biológicos uma vez que foi utilizado um tempo de extração inferior e encontrado um potencial antimicrobiano similar ao dos demais extratos em estudo. Dentre as concentrações testadas, o extrato EB-4 mostrou potencial de inibição da formação do biofilme e de erradicação do biofilme pré-formado a partir de 2 mg/mL (tabela 6). Nesta concentração tanto a inibição como a erradicação foi de 100%. Já abaixo dessa concentração, não foi encontrada atividade antibiofilme do extrato de *B. pilosa*.

TABELA 6: Percentual de inibição da formação e da erradicação de biofilmes produzidos por *S. aureus* (ATCC25923 e 4 isolados de leite mastítico) após exposição a diferentes concentrações (mg/mL) do extrato bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4) de extração com etanol 70%.

EB-4 (mg/mL)	INIBIÇÃO (%)	ERRADICAÇÃO (%)
2,00	100	100
1,00	49,9	35,7
0,50	45,6	35,6
0,25	44,6	31,09
0,13	44,2	31,04
0,06	43,3	22,4
0,03	41,5	20,9
0,01	31,4	19,8

A concentração do extrato de *B. pilosa* necessária a inibição e erradicação dos biofilmes de *S. aureus* foi quase 10 vezes superior a atividade antimicrobiana encontrada no teste de microdiluição em caldo (tabela 5). Tal resultado demonstra a maior dificuldade de se controlar tanto a formação como a erradicação de biofilmes comparado ao crescimento de bactérias plânctônicas. Por outro lado, os resultados obtidos com o revelador resazurina (figura 6A), seguido de replaqueamento (figura 6B), indicaram a ausência de células viáveis quando utilizou-se a concentração de 2 mg/mL do extrato. Portanto, nesta concentração houve a completa inibição e erradicação dos biofilmes e das bactérias. Além da inibição e erradicação do desenvolvimento dos biofilmes, a ausência de células viáveis é altamente desejável no tratameto da mastite, pois, ao eliminar completamente o patógeno, o tratamento se torna mais eficiente e com menores chances de reinfecção da glândula e/ou menores chances de desenvolvimento de quadros de resistência ao antimicrobiano utilizado.

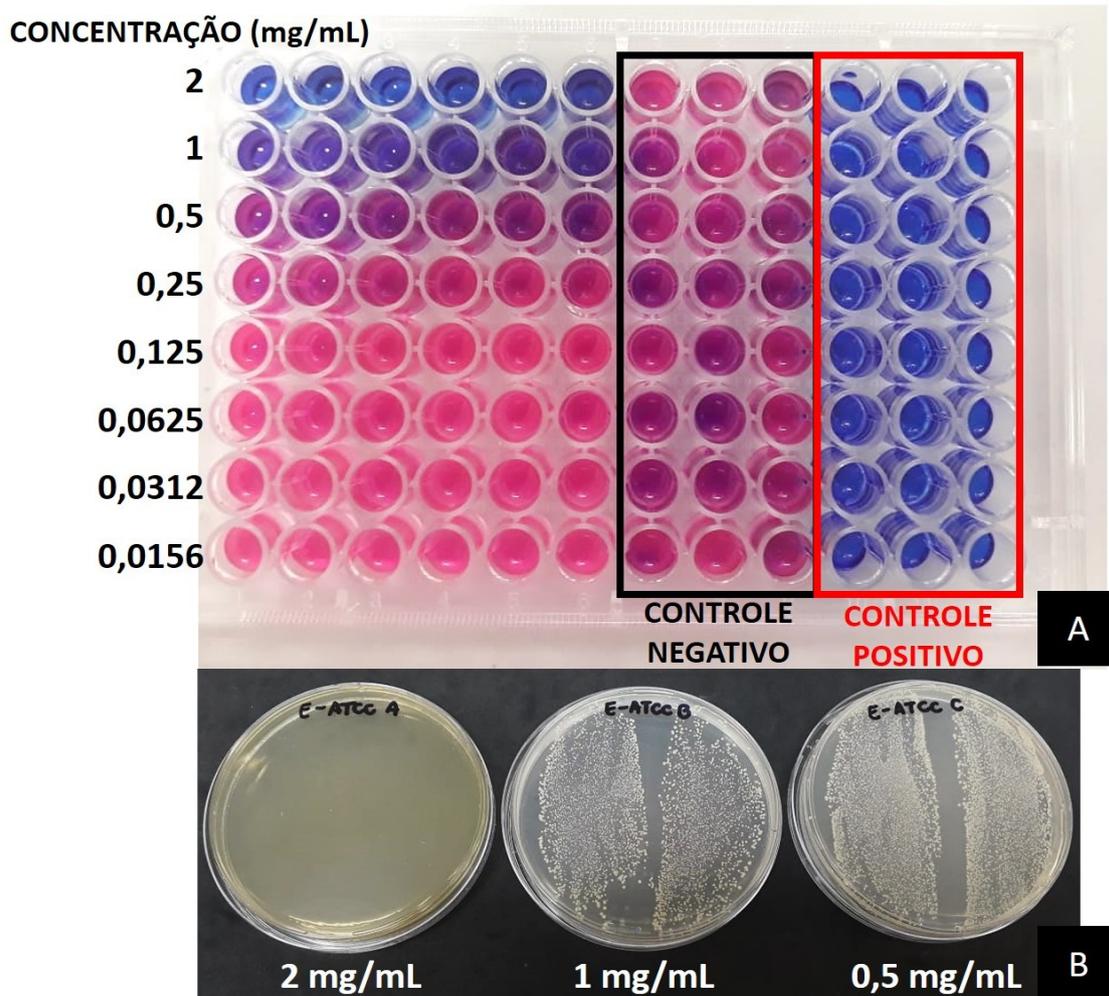


Figura 6: (A) Microplaca revelada com o corante resazurina indicando a ausência (cor azul) e presença (cor rosa) de crescimento bacteriano quanto expostas à diferentes concentrações do extrato EB-4. (B) Plaqueamento dos poços com ausência de crescimento (2 mg/mL) bacteriano e das duas concentrações abaixo (1 mg/mL e 0,5 mg/mL).

A dificuldade de se controlar bactérias formadoras de biofilmes está relacionada a capacidade de desenvolvimento de mecanismos de defesas das células bacterianas que podem desacelerar seu crescimento em meio a agentes sanitizantes e antimicrobianos, além da capacidade de neutralizar estes agentes e dificultar a sua penetração na matriz formada (ROSSI & PORTO, 2009). Esta habilidade é o que pode levar à um quadro de alta resistência aos farmacos mais comuns, dificultando sua erradicação até mesmo no ambiente. Em ensaios sobre a susceptibilidade de isolados formadores de biofilmes provenientes de aparelhos de ordenha, foi visto que só foi possível desinfetar completamente sua superfície após 10 min de contato com o agente sanitizante (NaOCl a 150 ppm),

tendo sido observada resistência dos isolados com até 5 minutos de contato (MELO et al, 2014; AMARAL et al., 2004).

Os resultados aqui apresentados revestem-se de importância uma vez que até o presente momento não foram encontrados trabalhos de atividade antibiofilme de extratos de *B. pilosa*. Para outros extratos vegetais, a mesma dificuldade de inibição e erradicação de biofilmes está relatada na literatura (Silva et al., 2019; QUAVE et al., 2008; WOJNICZ et al., 2012; LAPLANTE et al., 2012). Silva et al. (2019), como exemplo, verificaram que mesmo que todos os extratos de *Commiphora leptophloeos* tenham apresentado ação antimicrobiana frente aos 60 isolados de *S. aureus*, quando avaliados frente aos biofilmes, apenas foram capazes de inibir seus estágios iniciais de formação.

Em um outro estudo sobre o potencial de inibição de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosas* visando o tratamento de ferimentos, utilizando 4 tipos de mel neo-zelandeses observou-se a erradicação dos biofilmes em concentrações semelhantes às obtidas com os testes antimicrobianos. Entretanto, após a aplicação de sucessivas subdoses dos mesmos 4 tipos de mel, foi observada um leve aumento na resistência dos biofilmes sob os agentes antimicrobianos (LU et al., 2019).

Citotoxicidade

Os resultados do efeito do extrato EB-4 sobre a viabilidade das células MAC-T estão mostrados na tabela 7. Pode-se verificar que abaixo de 0,1 mg/mL a viabilidade celular foi superior a 80%. O valor de IC50, que corresponde à concentração necessária para inibir 50% das células viáveis foi 0,156 mg/mL. Os resultados encontrados estão de acordo com a confirmação visual da microplaca contendo as diferentes concentrações do extrato após a adição do MTT (imagem 6).

TABELA 7: Percentual de viabilidade* (%) das células da linhagem MAC-T após exposição a diferentes concentrações (mg/mL) do extrato bruto da parte aérea de *B. pilosa* após 4 h (EB-4) de extração com etanol 70%.

EB-4 (mg/mL)	INIBIÇÃO (%)
0,4	12,2 ± 1,08

0,2	34,2 ± 4,80
0,1	85,5 ± 5,42
0,05	95,8 ± 4,09
0,025	100 ± 4,91
0,012	100 ± 4,08

* Média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

A maior parte dos estudos sobre a atividade citotóxica de extratos de *B. pilosa* está relacionada a investigação da sua possível atividade antitumoral. Alguns autores tem verificado um potencial anti-cancerígeno para esta planta, o qual tem sido relacionado a ação dos poliacetilenos. A interação desses com o DNA, segundo os autores, resultaria na sua clivagem, alterando sua conformação e influenciando em seu padrão de migração (KVIESCINSK et al., 2011). Tal efeito já foi evidenciado frente à linhagem celular de câncer de mama (LCF-7), mas não frente à linhagem celular de adenocarcinoma alveolar (A549) (KVIESCINSK et al., 2011; SHEN et al., 2018).

Nos estudos de citotoxicidade frente a células tumorais, o IC50 do extrato bruto de *B. pilosa* pode variar entre 83 ug/mL e 437 ug/mL, sendo os extratos hidroalcoólicos os menos citotóxicos (KVIESCINSK et al., 2008).

Por fim, é importante destacar que o valor de IC50 do extrato EB-4 (0,156 mg/mL) encontrado no ensaio de citotoxicidade foi cerca de metade da CIM (0,3 mg/mL) no ensaio de atividade antimicrobiana. Esse resultado sugere citotoxicidade moderada do extrato para as células MAC-T, sugerindo cautela na sua administração intramamária. Por outro lado, considerando o seu potencial antimicrobiano, justifica-se o desenvolvimento de estratégias visando a diminuição do efeito citotóxico e sua aplicação no tratamento da mastite bovina.

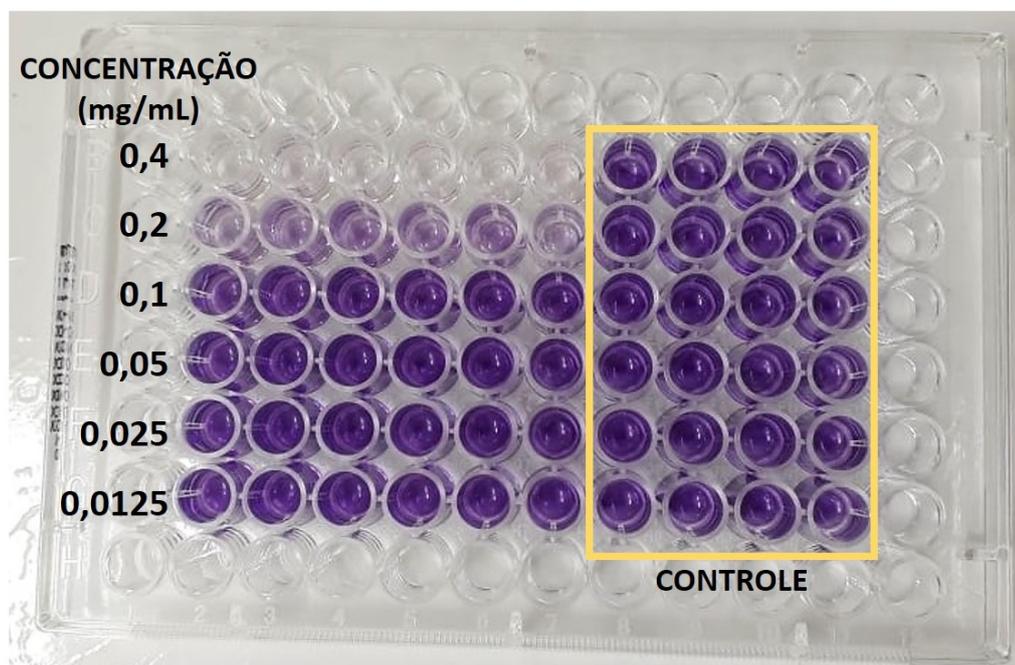


Imagem 6: Revelação da microplaca contendo as células MAC-T após a exposição a diferentes concentrações (mg/mL) do extrato bruto de *B. pilosa* após 4 h de extração etanólica (70%) através do método do MTT.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que, a despeito das diferenças no perfil químico dos extratos em função dos tempos de extração testados, o potencial antimicrobiano dos extratos de *B. pilosa* foi similar. Além do potencial antimicrobiano, ficou evidenciado a citotoxicidade moderada frente às células MAC-T e o potencial na inibição da formação e erradicação dos biofilmes formados por *S. aureus*, atividade descrita pela primeira vez para o extrato de *B. pilosa*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou avaliar o potencial dos extratos bruto de *B. pilosa* obtidos utilizando diferentes tempos de extração (4 e 48 horas e 7 dias) no tratamento da mastite bovina. Apesar das diferenças químicas encontradas entre os 3 extratos, estas não interferiram na atividade antimicrobiana em estudo. Do ponto de vista tecnológico, o extrato bruto de *B. pilosa* preparado com 4 h representou uma importante vantagem em relação aos outros, devido ao tempo muito menor de preparação. Entretanto, do ponto de vista prático, o maior tempo de extração pode representar uma vantagem para o produtor que deseja fazer uso desse extrato à campo. A possibilidade de poder manter o processo extrativo por 7 dias, sabendo que sua atividade antimicrobiana não será afetada, colabora com a rotina e praticidade da unidade de produção, incentivando sua utilização por parte do produtor.

A nível tecnológico, diversas outras formas de otimização e reconhecimento do seu potencial biológico podem ser exploradas antes de se formular um produto, como conhecer sua capacidade de permeação nos tecidos e atividade antimicrobiana frente a outros patógenos associados a mastite bovina. Na otimização, a sua associação com a nanotecnologia, por exemplo, pode resultar em maior tempo de conservação dos compostos ativos e maior biodisponibilidade dos compostos de interesse nos tecidos, elevando sua eficiência.

Além disso, ainda é possível explorar sua utilização em outras aplicações, como na forma de agente desinfetante, através de ensaios biológicos adequados. Isso confere novos nichos de mercado para a utilização desta planta, além de servir de subsídio para os sistemas de produção orgânico ou agroecológico.

REFERÊNCIAS

ADEPAPO, A. et al. 2011. **Comparison of the nutritive value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Bidens pilosa* and *Chenopodium***. Acta Pol. Pharm., v. 68, p. 83-92.

ALIGIANNIS, N. et al. 2001. **Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species**. J. of Agric. Food Chem., v. 40, p. 4168-4170.

ALONSO, M.M. et al. 2020. **In Vitro Antimicrobial Activity of Mexican Plants on Bovine Mastitis Bacteria: Preliminary Studies**. Biosci. J., v. 36, n. 1, p. 183-190.

AMARAL, L.A. et al. 2004. **Avaliação Da Eficiência Da Desinfecção De Teteiras E Dos Tetos No Processo De Ordenha Mecânica De Vacas**. Pesq. Vet. Bras., v. 24, p. 173-177.

ANVISA. 2010. **RDC 10/2010**. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_10_2010_COMP.pdf/6d4feca0-9b45-48f8-b44e-231fa048e4a6?version=1.0> Acesso em: Janeiro de 2020.

ANVISA. 2013. **Consolidação de Normas da COFID – Versão IV**. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Consolidado+de+normas+da+Cofid+-+Vers%C3%A3o+IV/4ba7b97b-dd0c-4574-949a-63dc60ea7f68>>
Acesso em: Fev de 2020.

ANVISA. 2020. **Consulta de Registros de Fitoterápicos**. Disponível em: <
<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/?substancia=21152&situacaoRegistro=V>> Acesso em Fevereiro de 2020.

ASHAFA, A.O.; AFOLAYAN, A.J. 2009. **Screening the Root Extracts from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* (Asteraceae) for antimicrobial potentials**. J. Med. Plant, v. 3, p. 568-572.

BAHMANI, M. et al. 2014. **Ethnobotanic Study Of Medicinal Plants In Urmia City: Identification And Traditional Using Of Antiparasites Plants**. As. Pac. J. of Trop. Dis., v. 4, p. 906-910.

BAIRWA, K. et al. 2010. **An update review on *Bidens pilosa* L.** Pharma Chemica, v. 2, p. 325-337.

BARBALHO, T.C.F.; MOTTA, R.A. 2001. **Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco**. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v2, p. 31-36.

BARTOLOME, A.P. et al. 2013. **Bidens pilosa L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology.** Hind. Pub. Corp., v. 2013, 51 p.

BASANISI, M.G. et al. 2017. **Genotyping of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Isolated From Milk and Dairy Products in South Italy.** Food. Micr., v. 62, p. 141-146.

BASKARAN, S.A. et al. 2009. **Antibacterial Effect of Plant-Derived Antimicrobials on Major Bacterial Mastitis Pathogens In Vitro.** Am. Dairy Sci. As., v. 93, p. 1423-1429.

BRANDÃO, M.G.L. et al. 1997. **Antimalarial Activity of Extracts And Fractions From *Bidens Pilosa* and Other *Bidens* Species (Asteraceae) Correlated with The Presence of Acetylene and Flavonoid Compounds.** J. of Ethn., v. 57, p. 131-138.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** LWT - Food Sci. and Tech., v. 28, p. 25-30.

BRASIL. 2009. **Normativa 26/2009.** Disponível em: <
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>>
Acesso em Janeiro de 2020

BRASIL. 2011. **Normativa 46/2011.** Disponível em: <
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view>> Acesso em Janeiro de 2020.

CENCI, F.B. et al. 2007. **Effects of Condensed Tannin from *Acacia mearnsii* on Sheep Infected Naturally with Gastrointestinal Helminthes.** Vet. Par., v. 144, p. 132-137.

CHAVASCO, J.M. et al. 2014. **Evaluation of Antimicrobial And Cytotoxic Activities of Plant Extracts from Southern Minas Gerais Cerrado.** Rev. Inst. Med. Trop., v. 56, p. 12-20.

CHIANG, Y. et al. 2007. **Cytopiloyne, a Novel Polyacetylenic Glucoside from *Bidens pilosa*, Functions as a T Helper Cell Modulator.** J. of Ethno., v. 3, p. 532-538.

CHIANG, Y. et al. 2004. **Metabolite Profiling and Chemopreventive Bioactivity of Plant Extracts from *Bidens pilosa*.** J. of Ethno., v. 95, p. 409-419.

CHIAVARI-FREDERICO, M.O. et al. 2019. **Antimicrobial Activity Of Asteraceae Species Against Bacterial Pathogens Isolated From Postmenopausal Women.** P. one, v. 15.

CHUNG, C. et al. 2016. **Cytopiloyne, a Polyacetylenic Glucoside from *Bidens pilosa*, Acts as a Novel Anticandidal Agent Via Regulation of Macrophages.** J. of Ethno., v. 184, p. 72-80.

DALANEZI, F. et al. 2019. **Influence of Pathogens Causing Clinical Mastitis on Reproductive Variables of Dairy Cows.** J. of Dai. Sci.,v. 103, p. 3648-3655.

DE SÁ, J. et al. 2018. **Os Principais Microorganismos Causadores da Mastite Bovina e Suas Consequências na Cadeia Produtiva de Leite.** Rev. Br. De Gest. Amb., v. 12, p. 01-13.

DEBA, F. et al. 2008. **Chemical Composition and Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of The Essential Oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*.** Food Cont., v. 19, p. 346-352.

DKHIL, M.A. et al. 2020. **Anthelmintic and Antimicrobial Activity of *Indigofera oblongifolia* Leaf Extracts.** J. of Bio. Scie., v. 27, p. 594-598.

EMBRAPA. 2019. **Anuário do Leite.** EMBRAPA – Gado Leite, edição 2019, p - 6-8.

FILHO, E. et al. 2018. **Effects of a mucoadesive formulation containing the extracts of curcuma longa L. (zingiberaceae) and bidens pilosa L. (asteraceae) in the treatment of oral mucosite: non-clinical and clinical phase I studies.** Tese: PPGCS – UFG, Goiânia.

FIODALISI, S.A. et al. 2014. **The Effects Of Brazilian Propolis On Etiological Agents Of Mastitis And The Viability Of Bovine Mammary Gland Explants.** J. of Dai Sci., v. 99.

FUKUYAMA, N. et al. 2012. **Antimicrobial Polyacetylenes from *Panax ginseng* Hairy Root Culture.** Hem. And Pharm. B., v. 60.

FUMAGALI, E. et al. 2008. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*.** Rev. bras. farmacogn., vol.18, p.627-641.

GOMES, F. et al. 2016. **Bovine Mastitis Disease/Pathogenicity: Evidence Of The Potential Role Of Microbial Biofilms.** Pathog Dis., v. 74.

GOMES, F. et al. 2018. **Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen.** Ind. Crops and Prod., v. 112, p. 515–520.

GOMES, F. et al. 2019. **Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis.** Heliyon, v. 5.

GUERRA, S.T. et al. 2020. **Short Communication: Investigation of Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Genes, Bacterial Motility, and Multidrug Resistance Pattern of Strains Isolated from Dairy Cows with Different Severity Scores of Clinical Mastitis.** J. of Dai. Sci., v. 103, p. 3606-3614.

GUO, Q.I. et al. 2007. **Studies On The Chemical Constituents From *Inula cappa*.** J. of Chin. Med. Mat., v. 30, p. 35-37.

HERTL, J. et al. 2018. **Does Clinical Mastitis In The First 100 Days Of Lactation 1 Predict Increased Mastitis Occurrence And Shorter Herd Life In Dairy Cows?.** J. of Dai. Sci., v. 101, p. 2309-2323.

HOLETZ, F.B. et al. 2002. **Screening Of Some Plants Used In The Brazilian Folk Medicine For The Treatment Of Infectious Diseases.** Ins. Osw. C., v. 97, p. 1027–1031.

HSU, Y. et al. 2009. **Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract.** J. of Ethno., v. 122, p. 379-83.

HU, H. et al. 2018. **Chemical Constituents from *Bidens bipinnata* Linn.** Bio. Sys. And Eco., v. 79, p. 44-49.

HUGHES, K. et al. 2019. **A Selection of Eleven Plants Used as Traditional Polynesian Cosmetics and Their Development Potential as Anti-Aging Ingredients, Hair Growth Promoters and Whitening Products.** J. of Ethno., v. 245, p. 121-159.

HUYNH, H. et al. 1995. **HH2A, An Immortalized Bovine Mammary Epithelial Cell Line, Expresses The Gene Encoding Mammary Derived Growth Inhibitor (MDGI).** In Vitro Cell. Dev. Biol., v.31, p.25-29.

Jaworski, A.; Lee, C. 1987. **Fractionation and HPLC Determination of Grape Phenolics.** J. of Agric. Food Chem., v. 35, p. 257-259.

JUTE, R. et al. 2017. **Herbal Medicinal Products – Evidence And Tradition From A Historical Perspective.** J. of Ethno., v. 207, p. 220-225.

KRUMMENAUER, A. et al. 2019. **Atividade Antimicrobiana de Extratos Naturais Sobre Bactérias Causadoras da Mastite Bovina.** J. of Bio. And Pharm. And Agric. Man., v. 15.

KVIECINSKI, M.R. et al. 2011. **SFE From *Bidens pilosa* Linné to Obtain Extracts Rich in Cytotoxic Polyacetylenes With Antitumor Activity.** J. of Sup. C. Flu., v. 56, p. 243-248.

- LANGONI, H. et al. 2017. **Considerations on the treatment of mastitis.** Pesq. Vet. Br., v. 37, p. 1261– 1269.
- LAPLANTE, K.L. et al. 2012. **Effects of Cranberry Extracts on Growth and Biofilm Production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species.** Phyto. Res., v. 26, p. 1371-1374.
- LEE, W. et al. 2013. **Extraction of antioxidant components from *Bidens pilosa* flowers and their uptake by human intestinal Caco-2 cells.** Mol., v. 18, p. 582-601.
- LI et al. 2019. **Protective Effects of Total Flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on Animal Liver Injury and Liver Fibrosis.** J. of Ethno., v. 116, p. 539-546.
- LORENZI, H. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Ed. Plantarum. 2ª edição.
- LU, J. et al. 2019. **Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** Nature – Sci. Rep., v. 9.
- MANANDHAR, S. et al. 2019. **In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria.** J. of Trop. Med., v. 2019, 5 p.
- MANILAL, A. et al. 2020. **In vitro antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts.** Hel., v. 6.
- MANYA, M.H. et al. 2020. **Antimalarial Herbal Remedies of Bukavu And Uvira Areas in DR Congo: an Ethnobotanical Survey.** J. of Ethno., v. 249, p.
- MATHUR, A. et al. 2010. **Antimicrobial Activity of Plants Traditionally Used as Medicines Against Some Pathogens.** J. of Chem., v. 3, p. 615-620.
- MCDUGALL, S. et al. 2007. **Clinical and Bacteriological Response to Treatment of Clinical Mastitis with One of Three Intramammary Antibiotics.** NZ Vet. J., v. 55, p. 161-170.
- MELO, P.C. et al. 2014. **Efeito do hipoclorito de sódio em biofilmes produzidos por *Staphylococcus aureus* isolados do ambiente de ordenha e de vacas com mastite.** Pesq. Vet. Bras., vol.34, p.109-113.
- MELO, P. et al. 2012. **Análise Fenotípica e Molecular da Produção de Biofilmes por Estirpes de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Casos de Mastite Subclínica Bovina.** Bio. J., v. 28, p. 94-99.
- MENDONÇA, E. et al. 2012. **Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** Pesq. Vet. Br., v. 32, p. 859-864.

MOYO, S.M. et al. 2020. **Influence of boiling and subsequent phases of digestion on the phenolic content, bioaccessibility, and bioactivity of *Bidens pilosa* (Blackjack) leafy vegetable.** Food. Chem., v. 311.

MULLER, E.E. et al. 2002. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite.** Anais do II Sul Leite

NASCIMENTO, P.F.C et al. 2007. **Atividade Antimicrobiana Dos Óleos Essenciais: Uma Abordagem Multifatorial Dos Métodos.** Br. J. of Pharm., v. 17, p. 108-113.

NCCLS. 2016. **Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana.** M100-S15, v. 25.

NETO, M. L. et al. 2018. **Avaliation Anti-Candida of Essential Oils From Three Medicinal Plants Species (Astereaceae).** S. Afr. J. of Bot., v. 115, p. 132-137.

NICKERSON, C.S.; AKERS, R.M. 1984. **Biochemical and ultrastructural aspects of milk synthesis and secretion.** Int. J. of Biochem., v. 16, p. 855-865.

OLIVEIRA, F. et al. 2004. **New Evidences of Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* Roots Extract Correlated with Polyacetylene and Flavonoids.** J. of Ethno., v. 93, p. 39-42.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E. **Antimicrobial resistance of mastitis pathogens.** Vet. Clinics: Food An. Prac., v. 28, p. 165-185.

OSZMIANSKI, J et al. 1988. **Fractionation of Phenolic Compounds in Red Wine.** Amer. J. of Enol. And Vit., v. 39.

PANDA, S.K. et al. 2020. **Indian Medicinal Plant Extracts to Control Multidrug-Resistant *S. aureus*, Including in Biofilms.** S. Afr. J. of Bot., v. 128, p. 283-291.

PERES, N.F; ZAPPA, V. 2011. **Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura.** Rev. Cie. Elet. de Med. Vet., v.16, p.1-28.

PINHEIRO MACHADO, G. et al. 2019. **Development Of Propolis Nanoparticles For The Treatment Of Bovine Mastitis: In Vitro Studies On Antimicrobial And Cytotoxic Activities.** Can. J. of An. Sci., v. 99, p. 713-723.

POPOVA, M. et al. 2004. **Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-Type Propolis.** Phyto. Anal., v. 15, p. 235-240.

PYORALA, S. 2008. **Mastitis in Post-Partum Dairy Cows.** Rep. In Dom. An., v. 43, p. 252-259.

QUAVE, C. et al. 2008. **Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. J. of Ethno., v. 118, p. 418-428.

RABE, T.; STADEN, J. 1997. **Antibacterial Activity of South African Plants Used for Medicinal Purposes**. J. Ethno., v. 56, p. 81-87.

REZENDE, H.A.; COCCO, M. 2002. **A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural**. Ver. Esc. Enferm., v. 36.

RIBEIRO, M. et al. 2008. **Microrganismos Patogênicos, Celularidade e Resíduos de Antimicrobianos no Leite Bovino Produzido no Sistema Orgânico**. Pesq. Vet. Br., v. 29, p. 52-58.

RIBEIRO, R. et al. 2017. **Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used by Ribeirinhos in the North Araguaia Microregion, Mato Grosso, Brazil**. J. of Ethno., v. 205, p. 69-102.

RICCI, A. et al. 2017. **Risk For The Development of Antimicrobial Resistance (AMR) Due to Feeding of Calves With Milk Containing Residues of Antibiotics**. EFSA J., v. 15.

ROESCH, M. et al. 2007. **Subclinical Mastitis In Dairy Cows In Swiss Organic And Conventional Production Systems**. J. of Dai. Res., v. 74, p. 86-92.

ROJAS, J. et al. 2006. **Screening For Antimicrobial Activity Of Ten Medicinal Plants Used In Colombian Folkloric Medicine: A Possible Alternative In The Treatment Of Non-Nosocomial Infections**. BMC Comp. and Alt. Med., v. 6, p. 1-6.

ROSSI, A.C.; PORTO, E. 2009. **A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes**. USP – artigo técnico, p. 40-41.

SANTOS, S. et al. 2007. **Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes**. Br. J. of Pharm., v. 17, p. 215-219.

SANTOS, G. et al. 2018. **Antibacterial activity of irradiated extracts of *Anacardium occidentale* L. on multiresistant strains of *Staphylococcus aureus***. Ap. Rad. and Isot., v. 140, p. 327-332.

SARTORATTO, A. et al. 2004. **Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil**. Br. J. of Microb., v. 35, p. 275-280.

SCHRICK, F. et al. 2001. **Influence Of Subclinical Mastitis During Early Lactation On Reproductive Parameters**. J. of Dai. Sci., v. 84, p. 1407-1412.

SCHWARTZ, S. et al. 2010. **Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals.** J. of Antim. Chem., v. 65, p. 601-604.

SEIGLER, D.S. 1995. **Plant secondary metabolism.** Sprin. Sci & Bus. Med.

SHEN, Y. et al. 2018. **Anticancer Effect Of Petroleum Ether Extract From *Bidens Pilosa* L And Its Constituent's Analysis By GC-MS.** J. of Ethno., v. 217, p. 126-133.

SILVA, J. et al. 2007. **Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*.** Ver. Br. De Farm., v. 17, p. 572-577.

SILVA, F. et al. 2011. **Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L.** Mol., v. 16, p. 1070-1102.

SILVA, N. et al. 2014. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Of Lineage ST398 As Cause Of Mastitis In Cows.** L. in App. Micr., v. 59, p. 665-669.

SILVA, I. et al. 2019. **Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts from *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett Against *Staphylococcus* spp. Isolated from Cases of Mastitis in Ruminants.** Cien. An. Br., v. 20, p. 1-14.

SIMÕES, C. 1988. **Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae.** J. of Ethno., v. 22, p. 281–293.

SINGH, N. et al. 2016. **Acaricidal Activity Of Leaf Extracts Of *Dalbergia Sissoo* Roxb. (Fabaceae) Against Synthetic Pyrethroid Resistant *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.** Res. in Vet. Sci., v. 106, p. 1-6.

SINGH, G. et al. 2017. **Pharmacological potential of *Bidens pilosa* L. and determination of bioactive compounds using UHPLC-QqQ_{LIT}-MS/MS and GC/MS.** BMC – Comp. And Alt. Med., v. 17.

SINGLETON, V.A, ROSSI, J.A. 1965. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.** A. J. of Eno. and Viti., p. 144-158.

STEPANOVIC, S. et al. 2007. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** J. of Path. Micro. And Immun., v. 115, p. 891-899.

TEMPINI, P. et al. 2018. **Multidrug Residues And Antimicrobial Resistance Patterns In Waste Milk From Dairy Farms In Central California.** J. of Dai. Sci., v. 101, p. 8110-8122.

TOBINAGA, S. et al. 2009. **Isolation And Identification Of A Potent Antimalarial And Antibacterial Polyacetylene From *Bidens pilosa***. *Plant. Med.*, v. 75, p. 624–628.

TOMAZI, T.; SANTOS, M. 2020. Antimicrobial Use For Treatment Of Clinical Mastitis In Dairy Herds From Brazil And Its Association With Herd-Level Descriptors. *Prev. Med. Vet.*, v. 176.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. 2006. **Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna**. *Quim. Nova*, v. 29, p. 326-377.

WANG, J. et al. 1997. **Flavonoids from *Bidens pilosa* var. *radiata***. *Phyt.*, v. 46, p. 1275-1278.

WANG, R. et al. 2010. **Polyacetylenes and Flavonoids from the Aerial Parts of *Bidens pilosa***. *Nat. Prod. Chem.*, v. 76, p. 893-896.

WEI, W. et al. 2015. **Magnolol Inhibits the Inflammatory Response in Mouse Mammary Epithelial Cells and a Mouse Mastitis Model**. *Inflammation*, v. 38, p. 16–26.

WELLINGTON, K. et al. 2017. **Further Studies On South African Plants: Acaricidal Activity Of Organic Plant Extracts Against *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus (Acari: Ixodidae)***. *Vet. Par.*, v. 234, p. 10-12.

WOJNICZ, D. et al. 2012. **Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli***. *Urol. Resea.*, v. 40, p. 683-697.

WU, J. et al. 2012. **Investigation of the extracts from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata* Sch. Bip. for antioxidant activities and cytotoxicity against human tumor cells**. *J. of Nat. Med.*, v. 67, p. 17-26.

WU, J. et al. 2013. **Investigation of the extracts from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata* Sch. Bip. for antioxidant activities and cytotoxicity against human tumor cells**. *J. Nat. Med.*, v.67, p.17-26.

YANG, W. 2014. **Aspects of the Antidiabetic Plant *Bidens pilosa* L.** *Hin. Pub. Corp.*, v. 2014, p. 1-14.

YANG, F et al. 2020. **Short communication: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China**. *J. of Dai. Sci.*, v. 103, p. 840-845.

YUAN, L et al. 2008. **Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis**. *J. of Ethno.*, v. 116, p. 539-546.

YUNES, R. A. et al. 2001. **Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Quim. Nova, v. 24, p. 147–152.

ZAYED, M. et al. 2020. ***In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of metal nanoparticles biosynthesized using optimized *Pimpinella anisum* extract.** Col. And Surf. A: Phys. And Eng. Asp., v. 585.

ZHANG, S. et al. 2018. **Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China.** J. of Dai. Sci., v. 101, p. 3344-3355.

Anexo I: Certidão de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A29CCC6

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A29CCC6**
Usuário: **08999042979**
CPF/CNPJ: **089.990.429-79**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Bidens pilosa

Título da Atividade: **POTENCIAL DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE Bidens pilosa Linn (PICÃO PRETO) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Equipe

Isadora Nicole Lara Piccinin UFSC
Shirley Kuhnen UFSC

Parceiras Nacionais

83.899.526/0001-82 / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Data do Cadastro: **16/04/2020 15:11:59**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:07 de 09/09/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**