CAPÍTULO 3

Extrato etanólico de *Mangifera indica* L. reduz adesão de *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico

Roberta Torres Careli^{*1}; Diogo França Arruda²; Camila Ribeiro Rocha³; Emanuely Gomes Alves Mariano⁴; Adriana Gonçalves Freitas⁵; Eduardo Robson Duarte⁶

Resumo

Objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Mangifera indica* L. sobre células de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* aderidas por 48 h em superfície de aço inoxidável na presença de leite desnatado. Efeitos antibacterianos do extrato foram avaliados para a amostra *S. aureus* ATCC 25923 e dois isolados (S178 e S182) provenientes de leite de vacas com mastite, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), potencial de biotransferência, adesão bacteriana e sua ação sanitizante. A CIM foi de 0,625 mg·mL⁻¹ para as três bactérias analisadas, e uma CBM de 2,5 mg·mL⁻¹ para S178 e S182 e 1,25 mg·mL⁻¹ para *S. aureus* padrão. A média de células bacterianas biotransferidas dos cupons de aço inoxidável para o leite foi de 8,61 log UFC·mL⁻¹, enquanto a adesão média foi de 7,06 log UFC·cm⁻². Estes resultados indicam alto potencial de biotransferência e formação de biofilme das células de *S. aureus* em aço inoxidável na presença de leite bovino. A solução do extrato de manga promoveu uma redução de 1,36 log UFC·cm⁻² a contagem de *S. aureus* ATCC 25923; em 4,08 log UFC·cm⁻² a contagem de S178 e em 4,04 log UFC·cm⁻² a de S18, por um tempo de 10 min, na superfície de aço. O extrato etanólico de manga verde apresentou efeito bacteriostático e bactericida em *S. aureus* e *S. haemolyticus* isolados do leite mastítico, com uma eficácia média do extrato de 55,31% para S178 e S182 e 12,98% para a cepa padrão quando há formação de biofilme.

Palavras-chave: Adesão bacteriana. Extrato de manga. Sanitizante. Segurança de alimentos.

¹ Professor Associado; Universidade Federal de Minas Gerais.

² Engenheiro de Alimentos; Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Doutoranda em Biotecnologia; Universidade Estadual de Montes Claros.

⁴ Mestre em Produção Animal; Universidade Federal de Minas Gerais.

⁵ Engenheira de Alimentos; Universidade Federal de Minas Gerais.

⁶ Professor Titular; Universidade Federal de Minas Gerais.

* E-mail: robertacareli@ufmg.br.

Introdução

O leite é um produto com alto valor nutritivo e de importância para a alimentação humana, porém bastante perecível, com alto teor de umidade e todos os nutrientes que favorecem a proliferação de micro-organismos (SHABBIR *et al.*, 2020). Dessa forma, a presença de patógenos provenientes das glândulas mamárias infectadas dos animais resulta na contaminação subsequente do leite, nos equipamentos e utensílios de ordenha, dos tanques de expansão, influenciando assim seu padrão microbiológico (PACHA *et al.*, 2020).

Dentre as doenças que podem acometer o rebanho trazendo grandes prejuízos para a produção leiteira está a mastite, que é a inflamação da glândula mamária em que um dos principais agentes causadores são as bactérias do gênero *Staphylococcus* (ABRIL *et al.*, 2020; PACHA *et al.*, 2020). A contaminação por esses micro-organismos pode representar um risco de segurança alimentar, pois quando encontram condições favoráveis para sua multiplicação, produzem enterotoxinas termorresistentes, muitas vezes não sendo eliminadas quando submetidas aos tratamentos térmicos empregados no processamento do leite (GONET *et al.*, 2023).

Várias espécies bacterianas possuem a capacidade de mudar um estado individual (planctônico) para uma condição de comunidade, aonde melhoram sua capacidade de sobreviver em ambientes adversos (GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2021). Esse arranjo auto-organizado, conhecido como biofilme, consiste em uma estrutura microbiana tridimensional (3D) com células fixadas e envolvidas por uma matriz extracelular autoproduzida, composta por água, nutrientes, polissacarídeos, DNA e proteínas, que pode ser anexada a um substrato. Este processo dinâmico de biofilmes estabelece uma importante estratégia de proteção para as bactérias envolvidas nessa matriz, aumentando a sua resistência a agentes antimicrobianos (GEBREYOHANNES *et al.*, 2019).

Na cadeia produtiva de leite, um dos materiais comumente utilizado é o aço inoxidável. O uso desse tipo de superfície deve-se às características de resistência a corrosão, a altas temperaturas, por ser inerte, liso, impermeável, de fácil higienização e por apresentar custo relativamente baixo. Em razão dessas propriedades, esse material é utilizado nos tanques de expansão, nas tubulações de pasteurização e troca de calor e em diversos outros equipamentos envolvidos na produção de leite e derivados (ANDRADE, 2008). Porém, patógenos como *S. aureus* possuem a capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies desse material (LATORRE *et al.*, 2020; PACHA *et al.*, 2020).

O uso indiscriminado de antibióticos na produção de leite e de sanitizantes químicos tem contribuído para o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos normalmente utilizados no processo de higienização. Como alternativa para a higienização de equipamentos e

utensílios de aço inoxidável, tem-se testado compostos extraídos de plantas com ação bacteriostática e bactericida (DE PAULA *et al.*, 2021; MANILAL *et al.*, 2020).

Vários estudos já foram conduzidos em extratos obtidos de folhas, cascas de frutas, raízes, cascas do caule e caroços de *Mangifera indica* L. para verificar suas atividades antimicrobianas (ALAIYA; ODENIYI, 2023; JAHURUL *et al.*, 2015; RAJU *et al.*, 2019). Jahurul *et al.* (2015) revisaram o uso de sementes e cascas de manga na indústria alimentícia, assim como a atividade dos compostos bioativos nas partes da planta. O estudo relatou que a semente e a casca da manga contêm principalmente compostos fenólicos, como mangiferina, flavonoides e taninos, os quais podem estar relacionados com as características antimicrobianas. Raju *et al.* (2019) verificaram que caroços de manga, que geralmente são descartados, têm propriedades antitumorais e antibacterianas.

A manga é uma fruta de grande importância econômica e segundo a FAO (2003) é a variedade de fruta tropical dominante produzida no mundo. O plantio é realizado para a exploração comercial assim como a fruta também é cultivada em pomares domésticos para autoconsumo. É consumida *in natura* ou utilizada como matéria-prima para produtos industrializados (MANICA *et al.*, 2001).

Quantidade considerável de frutos verdes da manga se desprendem da planta na época da safra pela queda fisiológica ou por ação do vento ou de outros fatores ambientais. Além disso, utiliza-se a técnica do raleio para mangas, onde é reduzido o número de frutas da planta para aquelas que permanecem nela se desenvolvam melhor (EMBRAPA, 2000). Esse resíduo que tem seu destino para o descarte pode ser utilizado para a produção de sanitizantes na indústria de alimentos, caso verificado seu poder antimicrobiano.

Entretanto, pouco se conhece sobre a eficácia antimicrobiana do extrato do fruto verde da manga para bactérias patogênicas que afetam a produção de leite. Sendo assim, esta pesquisa avaliou-se a ação antibacteriana do extrato etanólico de frutos verdes de *Mangifera indica* L. frente células de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite mastítico, aderidas em superfície de aço inoxidável.

Material e Métodos

Coleta dos frutos e preparo do extrato

Frutos de *Mangifera indica* L., cultivar Ubá, foram coletados nos meses de setembro e outubro de 2021, na área de reserva do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus Montes Claros, MG (coordenadas 16°40'51,5"S e 43°50'32,1"W, altitude de 640 m). Foram selecionados os frutos em estágio de maturação verde, apresentando diâmetro de aproximadamente quatro centímetros.

Realizou-se a seleção dos frutos sem lesões, lavados com água clorada (200 ppm por 15 min) e posterior enxágue em água destilada. Os frutos inteiros foram triturados e o extrato etanólico foi obtido pela adição de 100 g do material vegetal em 1000 mL de etanol PA. Essa mistura foi armazenada em frasco âmbar por dez dias e acondicionada em local seco e isento de iluminação à temperatura de 23 °C. Foi realizada a filtração em funil com gaze e algodão e incubado em estufa com ventilação forçada a 40 °C por dois dias (NERY *et al.*, 2010 com modificações).

Obtenção e identificação dos isolados

O efeito antibacteriano dos extratos foi avaliado para a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e para os isolados S178 e S182, provenientes de leite de vacas com mastite, da raça Girolando, com 5 ± 1 anos de idade, criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

Para identificação molecular desses isolados, promoveu-se a extração e amplificação do DNA ribossomal, como descrito por Chapaval *et al.* (2008). Utilizou-se um par de iniciadores que se anelam em regiões conservadas dos genes 16S e 23S, 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCAT TCGGA 3'). Sequenciou-se o gene 16S rRNA pelo método de Sanger, utilizando-se o sequenciador automático MegaBACETM 1000 e os primers utilizados foram o 27F (5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') no Laboratório Myleus Biotechnology (REYSENBACH *et al.*, 2000). O resultado do sequenciamento foi verificado com o software SeqScanner, e os resultados comparados online no BLAST (banco de dados do NCBI). As bactérias foram identificadas com nível mínimo de 99% de similaridade.

Avaliação do efeito bacteriostático e bactericida

Para a avaliação dos efeitos bacteriostático e bactericida do extrato, foram realizados os testes de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Bactericida Mínima (CBM). A determinação da CIM do extrato de manga foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo (NCCLS, 2005). A concentração do extrato obtido foi 5,255 mg·mL⁻¹. A partir dessa concentração, realizou-se o preparo de 2,5 mL de soluções contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), nas concentrações de 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; e 5,0 mg·mL⁻¹ do extrato. Em seguida, 12,5 µL da suspensão de cada micro-organismo em cultura pura foram inoculadas, separadamente, em cada tubo contendo as soluções dos extratos previamente determinadas. Para o preparo das suspensões bacterianas, a cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 h, obtendo-se uma concentração final de 10⁸ UFC·mL⁻¹, utilizando como referência o padrão de turbidez

da escala de McFarland 0,5. Os controles das concentrações dos extratos não continham a suspensão microbiana. Todos os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 min e incubados a 35 °C por 24 h.

Para a determinação da CBM, uma alçada das suspensões dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo Ágar Tripton Soja (TSA), as quais foram incubadas a 37 °C ± 2 °C por 24 h para observação de crescimento microbiano (NCCLS, 2005).

Avaliação da adesão bacteriana

Para o estudo de adesão bacteriana, culturas ativas de cada estirpe foram centrifugadas a 9000 x g por 10 min e os *pellets* foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,85%. As suspensões bacterianas foram preparadas por ressuspensão dos *pellets* em água peptonada a 0,1% e inoculada em *Erlenmeyers* com 99 mL de leite desnatado esterilizado de modo a obter uma concentração celular de 10⁵ UFC·mL⁻¹, para cada sistema experimental. Em cada *Erlenmeyer* foram adicionados sete cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 com dimensões de 2,0 cm x 2,0 cm x 0,1 cm, previamente higienizados e esterilizados de acordo com Rossoni e Gaylarde (2000). A superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 foi escolhida por ser a mais empregada em tanques de expansão de leite. O uso do leite desnatado se deve ao fato de que os lipídios, presentes no leite integral, poderiam favorecer a adesão e a formação de biofilmes, superestimando-se, assim, a real capacidade do microrganismo (BOARI et al., 2009).

Esse sistema experimental foi mantido sob agitação constante em mesa agitadora orbital a 60 rpm de modo a simular a agitação do leite no tanque de expansão. Os cupons foram lavados com água destilada e transferidos para uma nova amostra de leite desnatado esterilizado, sem inoculação, após 24 h de condução do sistema experimental. Esse novo sistema foi mantido sob agitação de 60 rpm por mais 24 h, totalizando 48 h de adesão bacteriana (BOARI et al., 2009 com adaptações). Esse período foi dimensionado com base na legislação vigente para qualidade do leite cru, que estabelece como tempo máximo entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento onde será processado (MAPA, 2018). Para avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para o leite desnatado sem inoculação, alíquotas de 1000 µL foram retiradas e submetidas a diluições decimais seriadas sucessivas seguidas de plaqueamento em Ágar Sal Manitol a 35 °C ± 2 °C por 24 h (BOARI et al., 2009 com adaptações).

Para quantificação das células bacterianas aderidas, os cupons foram retirados, lavados em 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% para retirada de células planctônicas, transferidos para 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% e submetidos a banho ultrassônico por 2 min para desprendimento das células sésseis. Realizaram-se diluições decimais de cada amostra, com

plaqueamento em Ágar Sal Manitol a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 24 h e os resultados foram expressos em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ (BOARI *et al.*, 2009 com adaptações).

Sensibilidade das células ao extrato

Para testar a sensibilidade das células aderidas frente à solução do extrato, os cupons foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,85%. Em seguida, foram transferidos para a solução sanitizante, composto pelo extrato e água destilada esterilizada, nas concentrações bactericidas mínimas encontradas em testes anteriores para cada estirpe de *Staphylococcus* spp. A solução controle foi formulada com os mesmos componentes da solução de extrato, no entanto, sem a presença deste. Os tempos de contato dos tratamentos com o extrato e controle foram 5; 7,5 e 10 min. Esses períodos foram baseados no tempo de higienização de superfícies e utensílios utilizados nas indústrias de alimentos. Para a quantificação das células bacterianas após o contato com as soluções do extrato, foram realizados os procedimentos para a retirada de células aderidas descritos por Careli *et al.* (2009) e os resultados expressos em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Análise estatística

Esse experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Foi utilizado esquema fatorial 2 x 3 constituído por dois tratamentos (solução com extrato e controle) e três tempos de contato com o extrato (5; 7,5 e 10 min). Para verificar o efeito antibacteriano do extrato sobre as células aderidas, os valores de $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ foram transformados para $\log(x+1)$ a fim de atender a pressuposição de normalidade (CAIXETA *et al.*, 2012). Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey utilizando o Sistema de Análises Estatísticas – SAEG versão 9.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

Resultados e Discussão

A análise molecular identificou o isolado S178 como *S. aureus* e o isolado S182 como *S. haemolyticus* com similaridade mínima de 99%.

No teste para a detecção da CIM foram obtidos valores de $0,625\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a estirpe padrão e os isolados. No entanto, S178 e S182 mostraram-se mais resistentes ao efeito bactericida do extrato de manga, já que foi necessário o dobro de extrato em relação a cepa padrão (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), expressas em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, do extrato do fruto verde de *Mangifera indica* L. frente a cepas de *Staphylococcus* spp

Micro-organismo	CIM ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CBM ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
ATCC 25923	0,625	1,25
S178	0,625	2,5
S182	0,625	2,5

Fonte: Dos autores, 2022.

Outros estudos têm reportado valores de CIM e CBM superiores aos verificados nesta pesquisa. Bona *et al.* (2014) avaliaram o efeito antibacteriano de extratos etanólicos de outras frutas frente *S. aureus*. Verificaram uma CIM de $12,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ referente aos extratos etanólicos de jabuticaba (*Myciaria cauliflora*), goiaba (*Psidium guajava*) e jamelão (*Syzygium cumini*). O extrato de jamelão foi capaz de eliminar as células de *S. aureus* em CBM de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Osei-Djarbeng *et al.* (2020) conduziram um estudo para investigar e comparar a propriedade antimicrobiana de extratos etanólicos da casca de manga, folhas e caroço contra diferentes micro-organismos selecionados, através da diluição em caldo e método de difusão em poço de ágar. O estudo relatou que o extrato do caroço exibiu a maior atividade antimicrobiana entre os extratos. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato do caroço contra *S. aureus* foi de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Bshabshe *et al.* (2020) investigaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico do caroço de manga em isolados clínicos de *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) usando o método de difusão em disco *in vitro*. A atividade antibacteriana do extrato foi comparada aos resultados obtidos pelos antibióticos padrões (vancomicina, ampicilina e penicilina). O estudo relatou que o extrato de caroço de manga demonstrou atividade antibacteriana contra ambas as categorias de bactérias. Verificou-se que as cepas de MRSA são mais sensíveis ao extrato de caroço de manga quando comparadas ao medicamento de referência vancomicina. Além disso, o estudo relatou que MRSA mostrou 100% de sensibilidade à vancomicina, 100% de resistência à ampicilina e 98% de resistência à penicilina.

O alto teor de taninos hidrolisados e de compostos fenólicos presentes na casca e na amêndoa da manga foram associados ao seu efeito antimicrobiano (JAHURUL *et al.*, 2015).

Pode-se atribuir a ação antimicrobiana dos extratos de plantas pelo efeito tóxico que causa na membrana citoplasmática dos micro-organismos. Os compostos ativos desses extratos com propriedades hidrofóbicas possibilitam o particionamento dessas membranas alterando funções a permeabilidade (GARCIA; ORLANDA, 2014). Esses efeitos podem promover ruptura do fluxo de elétrons, alteração no transporte de moléculas na membrana, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático (COX *et al.*, 2000).

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os micro-organismos avaliados neste estudo quanto aos valores de potencial de biotransferência e adesão na superfície de aço inoxidável. De forma geral, a média de células das cepas bacterianas biotransferidas da superfície para o leite foi de $8,61 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os valores do potencial de biotransferência encontrados são preocupantes pois indicam alta capacidade de contaminação e de multiplicação dessas bactérias em leite, que pode causar sérios prejuízos econômicos e de saúde pública. Latorre *et al.* (2020) reforçam que os biofilmes formados por *S. aureus* em equipamentos de ordenha podem atuar como fonte de contaminação, comprometendo assim a qualidade microbiológica do leite utilizado para a fabricação de produtos lácteos.

Verificou-se uma concentração média de $7,06 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ de células aderidas em cupons de aço inoxidável pelas cepas avaliadas. A alta contagem de micro-organismos para a adesão nesse estudo aponta que houve formação de biofilme. Vargová *et al.* (2023) também observaram que *S. aureus*, isolados de leite e superfícies de ambiente de ordenha, foram capazes de formar biofilme em aço inoxidável, com contagens superiores a $5 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

A formação do biofilme é considerada uma adesão irreversível, sendo necessário aplicar força mecânica, agentes surfactantes, agentes sanitizantes e calor para a remoção dessa complexa comunidade microbiana aderida. Entretanto, após a higienização ainda podem ser encontradas células que possam contaminar os alimentos. Outro problema na indústria de alimentos é a capacidade de bactérias do biofilme se desprenderem e dispersarem por erosão ou abrasão, tornando-se uma fonte constante de contaminação (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

Não houve diferença ($p > 0,05$) para os tratamentos controle de cada micro-organismo à medida que se aumentou o período de exposição (Tabela 2). Para a estirpe padrão, no tempo de 10 min obteve-se a maior redução do número de células aderidas. Desta forma, o extrato foi capaz de reduzir em $1,36 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ a contagem de *S. aureus* ATCC 25923. Apesar de o número de células aderidas ter diminuído ($p < 0,05$), essa redução não foi satisfatória, pois em contagens de *S. aureus* acima de $10^5 \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou por grama de alimento é compatível com a formação da enterotoxina (SANTANA *et al.*, 2010).

As enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. podem resultar em gastroenterite aguda de evolução rápida e os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade de cada indivíduo. Uma mesma cepa de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de enterotoxina e doses baixas da enterotoxina é capaz de causar surtos, além disso é termorresistente e o período da intoxicação é de curto prazo de incubação (SANTANA *et al.*, 2010).

A eficácia do extrato frente a *S. aureus* ATCC 25923 mesmo no tempo de 10 min foi baixa comparada as outras cepas. Entretanto, a concentração do extrato utilizado para a cepa padrão foi metade da concentração para S178 e S182, conforme determinado em testes anteriores.

Para o isolado S178, houve diferença ($p < 0,05$) entre os tempos utilizados para o extrato de manga, porém o período de contato de 10 min reduziu em 4,08 log UFC·cm⁻² o número de células quando comparado a adesão (Tabela 2). Em todos os tempos de contato houve diferença entre o controle e o extrato de manga para a estirpe S182. A contagem de micro-organismos aderidos sobreviventes após 5,0 e 7,5 min de aplicação do extrato foi similar ($p > 0,05$). Após 10 min foi verificada redução de 4,04 log UFC·cm⁻² de células aderidas em relação ao valor verificado para o teste de adesão.

Tabela 2 – Contagem de células de *Staphylococcus* spp. aderidas em superfície de aço inoxidável, expressas em log UFC·cm⁻², após o tratamento com extratos do fruto verde de *Mangifera indica* L. nas concentrações bactericidas mínimas e solução controle expostas a diferentes tempos de contato

Micro-organismo (CBM)	Tempo**(min)	Log UFC·cm ⁻²		% eficácia*
		Controle	Extrato	
ATCC 25923 (1,25 mg·mL ⁻¹)	5,0	6,77 ^{Aa}	6,72 ^{Aa}	0,00 ^{Bb}
	7,5	6,61 ^{Aa}	6,56 ^{Ba}	1,71 ^{Bb}
	10,0	6,55 ^{Aa}	5,70 ^{Cb}	12,98 ^{Ab}
S178 (2,5 mg·mL ⁻¹)	5,0	7,13 ^{Aa}	6,73 ^{Aa}	5,45 ^{Cb}
	7,5	6,74 ^{Aa}	5,06 ^{Bb}	24,92 ^{Ba}
	10,0	6,84 ^{Aa}	2,98 ^{Cb}	55,40 ^{Aa}
S182 (2,5 mg·mL ⁻¹)	5,0	7,42 ^{Aa}	5,30 ^{Ab}	28,30 ^{Ba}
	7,5	7,10 ^{Aa}	5,38 ^{Ab}	24,29 ^{Ba}
	10,0	6,76 ^{Aa}	3,02 ^{Bb}	55,22 ^{Aa}

Fonte: Dos autores, 2022.

Legenda: CBM: Concentração Bactericida Mínima.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna (comparação entre os tempos) e minúscula na linha (comparação entre tratamentos) não diferem significativamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*Eficácia = 1 - (Controle) x 100, letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos avaliados para o mesmo isolado e letras minúsculas iguais indicam similaridade entre os isolados avaliados nos mesmos tempos.

** Teste de adesão (tempo 0) - concentração média de 7,06 log UFC·cm⁻² para as três cepas.

Foi observada maior eficácia para isolado *S. aureus* 178 no tempo de 10 min e apesar de ser da mesma espécie, a cepa padrão é isolada de humanos, enquanto a S178 foi isolada de leites de bovinos com mastite. A eficácia para o isolado S182 foi maior no tempo de 10 min e bem próximo a eficácia encontrada para S178. O tratamento, o tempo de contato e a espécie de micro-organismo avaliado influenciaram a eficácia do extrato (Tabela 2).

Diversos autores relatam micro-organismos coagulase negativa como causadores de mastite bovina. Um exemplo de uma espécie com essa característica é *S. haemolyticus*, cepa

predominantemente isolada de leite bovino (HOSSEINZADEH; SAEI, 2014; PATE *et al.*, 2011). Porém, poucos estudos relatam o uso de extratos vegetais na inibição desse patógeno.

Manzur *et al.* (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folha de manga em oito cepas de *S. aureus* isoladas de uma vaca com mastite e a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923. Todos os micro-organismos foram capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável e borracha, com contagens de células superiores a $7 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. O extrato etanólico a $45,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir os biofilmes na borracha (média de redução $3,91 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) e aço inoxidável (média de redução $3,87 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) após 5 min de contato.

O extrato etanólico de manga apresentou pouca eficácia na redução da contagem de células da estirpe padrão e considerável redução para as estirpes S178 e S182 isoladas do leite de animais com mastite. Esses resultados podem ser justificados pelos mecanismos de resistência de células dentro de um biofilme e pela interação que pode ocorrer entre a matéria orgânica no leite e os compostos ativos do extrato. Para contornar tal situação, uma possível opção seria a utilização de maior tempo de contato e/ou o aumento da concentração do extrato de manga verde.

Conclusão

O extrato etanólico de manga verde apresentou efeito bacteriostático e bactericida em *S. aureus* e *S. haemolyticus* isolados do leite de vacas com mastite. A redução do número de células para a cepa padrão foi insatisfatório mesmo no tempo de contato de 10 min com eficácia de redução do extrato de 12,98%. Os isolados se mostraram menos resistentes a ação do extrato com eficácia do mesmo em torno de 55%. Os biofilmes possuem mecanismos de proteção que diminuem ou impedem a ação de agentes antimicrobianos. Para futuras investigações, sugere-se o aumento da concentração do extrato e/ou maior tempo de contato com as cepas aderidas. Assim como, avaliar a possibilidade do uso do extrato como possível agente sanitizante para equipamentos de ordenha bovina na cadeia de produção de leite.

Referências

ABRIL, A. G. *et al.* *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 537, 2020.

ALAIYA, M. A.; ODENIYI, M. A. Utilization of *Mangifera indica* plant extracts and parts in antimicrobial formulations and as a pharmaceutical excipient: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 29, 2023.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, 412p.

BSHABSHE, A. A. *et al.* Clinical relevance and antimicrobial profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on routine antibiotics and ethanol extract of mango kernel (*Mangifera indica* L.). **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

BOARI, C. A. *et al.* Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

CAIXETA, D. S. *et al.* Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 142-150, 2012.

CARELI, R. T. *et al.* The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

CHAPAVAL, L. *et al.* An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 299-306, 2008.

COX, S. D. *et al.* The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p.170-175, 2000.

DE PAULA, N. R. F. *et al.* Desenvolvimento de Blends de óleos essenciais e compostos majoritários no controle de microrganismos indicadores e patogênicos veiculados por alimentos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 102290-310, 2021.

EMBRAPA, Ministério da Agricultura e do Abastecimento Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manga pós-colheita**. Brasília, DF, 2000. Disponível em: <<http://www.frutvasf.univasf.edu.br/images/mangaposcolheita.pdf>>. Acesso em 2 jun. 2023.

FAO, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Medium-term prospects for agricultural **Commodities: projections to the year 2010**. Roma, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e1a.ht>>. Acesso em 2 jun. 2023.

GARCIA, A. P. M.; ORLANDA, J. F. F. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico de *Mangifera indica* Linneau. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 189-198, 2014.

GEBREYOHANNES, G. *et al.* Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02192, 2019.

GONET, M. *et al.* Stability and resistance to proteolysis of SEC and SEL enterotoxins produced by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Foodborne Diseases**, v. 20, n. 1, p. 32-37, 2023.

GUZMÁN-SOTO, I. *et al.* Simulating biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. **Iscience**, v. 24, n. 5, p. 102443, 2021.

HOSSEINZADEH, S.; SAEI, H. D.; *Staphylococcal species* associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27-34, 2014.

JAHURUL, M. H. A. *et al.* Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. **Food Chemistry**, v. 183, p. 173-180, 2015.

LATORRE, A. *et al.* On-farm surfaces in contact with milk: The role of *Staphylococcus aureus*-containing biofilms for udder health and milk quality. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 1, p. 44-51, 2020.

MANICA, I. *et al.* **Manga**: tecnologia, produção, pós colheita, agroindústria e exportação. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 617p.

MANILAL, A. *et al.* *In vitro* antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03303, 2020.

MANZUR, A.G.B. *et al.* Extract of *Mangifera indica* L. leaves may reduce biofilms of *Staphylococcus* spp. in stainless steel and teacup rubbers. **Food Science and Technology International**, v. 26, n. 1, p. 11-20, 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 77, de 26/11/2018; **Diário Oficial da União (DOU)**, Brasília, No. 230, de 30/11/2018, p. 10. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2018/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-77.2018.pdf>>. Acesso em 20 maio 2023.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em 18 maio 2023.

NERY, P. S. *et al.* Effect of *Anacardium humile* on the larval development of gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1, p. 361-364, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Microbial biofilms in the food industry: a review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 97-106, 2010.

OSEI-DJARBENG, S. N. *et al.* Comparative antimicrobial activities of ethanolic extracts of leaves, seed and stem bark of *Mangifera indica* (Mango). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 1240-1243, 2020.

PACHA, P. A. *et al.* Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3522-3531, 2021.

PATE, M. *et al.* Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, s/n., p. 1-6, 2011.

RAJU, N. V. *et al.* In-vitro studies on antitumour and antimicrobial activities of Methanolic kernel extract of *Mangifera indica* L. cultivar Banganapalli. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 357-362, 2019.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa., 2001. 301p.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 545-554, 2010.

SHABBIR, M. A. *et al.* Effect of non-thermal processing techniques on pathogenic and spoilage microorganisms of milk and milk products. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 279-294, 2020.

VARGOVÁ, M. *et al.* Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* obtained from surfaces and milk of mastitic cows. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 6, p. 386, 2023.

WIRTANEN, G. *et al.* Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 727-733, 1996.