

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**Caracterização de Treze Cepas de *Zymomonas mobilis* Tolerantes ao  
Ácido Clorídrico e à Bile Bovina**

**Karen Pena de Souza Cavalcanti**

**Recife – 2004**

**Karen Pena de Souza Cavalcanti**

**Caracterização de Treze Cepas de *Zymomonas mobilis* Tolerantes ao  
Ácido Clorídrico e à Bile Bovina**

**Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia de Produtos  
Bioativos do Departamento de Antibióticos do  
Centro de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Pernambuco para obtenção do título  
de Mestre**

**Área de concentração: Microbiologia Aplicada  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eulália Camelo Pessoa  
de Azevedo Ximenes**

**Recife – 2004**

**Cavalcanti, Karen Pena de Souza**

**Caracterização de treze cepas de *Zymomonas mobilis* tolerantes ao ácido clorídrico e à bile bovina / Karen Pena de Souza Cavalcanti. – Recife : O Autor, 2004**

**72 folhas : il., fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2004.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Ciências biológicas – Microbiologia. 2. Probióticos – Análise da capacidade de resistência – Trato digestivo. 3. *Zymomonas mobilis* – Tolerância ao ácido clorídrico e à bile bovina. I. Título.**

**579.22  
579.325**


**CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)**

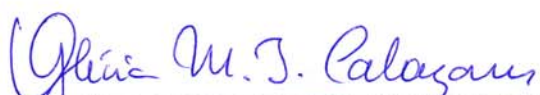
**UFPE  
BC2005-253**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *KAREN PENA DE SOUZA CAVALCANTI* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 18 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

  
Dra. MARIA DE FÁTIMA VIEIRA DE QUEIROZ SOUSA  
Departamento de Antibióticos - UFPE

  
Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS  
Departamento de Antibióticos - UFPE

  
Dr. ALMIR GONÇALVES WANDERLEY  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**Reitor**

Prof. Dr. AMARO HENRIQUE PESSOA LINS

**Vice-reitor**

Prof. Dr. GERALDO JOSÉ MARQUES PEREIRA

**Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Prof. Dr. CELSO PINTO DE MELO

**Diretor do Centro de Ciências Biológicas**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> ANA MARIA CABRAL

**Chefe do Departamento de Antibióticos**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> SILENE CARNEIRO DO NASCIMENTO

**Coordenadora da Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ALDA DE ANDRADE CHIAPPETA

**Vice-Coordenadora da Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. JULIANNA FERREIRA CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE

**Caracterização de Treze Cepas de *Zymomonas mobilis* Tolerantes ao  
Ácido Clorídrico e à Bile Bovina**

**Karen Pena de Souza Cavalcanti**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa**

**Departamento de Antibióticos**

**Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glícia Maria Torres Calazans**

**Departamento de Antibióticos**

**Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley**

**Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**Universidade Federal de Pernambuco**

*“Use a paciência.*

*E quando ela acabar,*

*Use a tolerância.*

*E quando ela findar,*

*Use o perdão.*

*E quando esqueceres de perdoar,*

*Use o amor...*

*E lembre-se que foi através do amor que Jesus nos perdoou,*

*Foi paciente, tolerante, manso e prudente.*

*Ame!*

*Ame, incessantemente!*

*E mesmo quando cansares,*

*Continues amando.*

*E amanhã, verás que*

*Valeu a pena!”*

*(Israelitas)*

Aos meus pais, Perseu Sales de Souza  
e Marluce Pena de Souza por permitirem a  
minha existência, todo carinho e confiança;

Aos meus filhos Alexandre e Natália;

Ao meu amor, João Carlos pela paciência,  
confiança e incentivo.

Dedico



## AGRADECIMENTOS

À Deus, a Nossa Senhora da Conceição que através de suas emanações positivas e principalmente divinas me confortaram nos momentos de angústias e me deram a certeza de uma finalização triunfante.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pela orientação, apoio e amizade dedicados durante o dia-dia na realização deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pela amizade conquistada durante todos os momentos em que estivemos juntos.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pelos ensinamentos e incentivo durante o decorrer do curso.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Antonia de Souza pela amizade e incentivo na minha vida profissional.

Às minhas eternas amigas Alaíde Lima dos Santos, Alaíde Régia Braga e Luciana Nascimento, por toda amizade, encorajamento, além dos exemplos de vida que tanto estimularam nestes últimas meses.

Aos Colegas do Laboratório Renato Oliveira e Flaviana Carvalho, pela amizade e solidariedade.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela convivência agradável de todos os dias.

À Maria Suely Cavalcanti, secretária do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pelo carinho, atenção e desempenho profissional.

A Dr<sup>a</sup>. Edna Sales, Chefe da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio e atenção, proporcionando a elaboração deste trabalho que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

A todos os funcionários técnico-administrativos da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade e solidariedade.

Ao meu grande amor, João Carlos Santana Cavalcanti, que durante todo os dias de nossa união vem confirmando todo o seu afeto, tornou-se para mim um porto seguro, onde sempre poderei encontrar amor, segurança, tranquilidade...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
3.1. Probióticos	18
3.1.1. Critérios de seleção de probióticos para uso humano	18
3.1.2. Mecanismo de ação dos probióticos	19
3.2. Microbiota gastro-intestinal	21
3.3. <i>Zymomonas mobilis</i>	27
3.3.1. Atividade antagonista da <i>Zymomonas mobilis</i>	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
4.1. Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico e à bile bovina	30
4.1.1. Microorganismos	30
4.1.1.1. Meios de cultura	30

4.1.1.2. Manutenção das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i>	32
4.1.1.3. Pré-fermentação	32
4.1.1.4. Padronização do inóculo de <i>Zymomonas mobilis</i>	32
4.1.1.5. Fermentação	32
4.1.1.6. Enumeração das culturas padronizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	32
4.1.1.7. Teste de Pureza	33
4.1.2. Avaliação da tolerância das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico	33
4.1.3. Avaliação da tolerância das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i> à bile bovina	33
4.2. Determinação da viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> em meio SSDL acidificado contendo bile bovina	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
5.1. Avaliação da tolerância das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico	37
5.2. Avaliação da tolerância das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i> à bile bovina	43
5.3. Avaliação da tolerância das culturas de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico e à bile bovina associados	49
<b>6. CONCLUSÕES</b>	60
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição bacteriana no trato digestivo humano.	22
<b>Figura 2A.</b> Esquema da avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico e à bile bovina.	34
<b>Figura 2B.</b> Esquema da avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico e à bile bovina.	35
<b>Figura 3.</b> Tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico. Cepas CP1, CP2, CP3 e CP4.	41
<b>Figura 4.</b> Tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico. Cepas Z <sub>180</sub> e Z <sub>280</sub> .	41
<b>Figura 5.</b> Tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico. Cepas Z <sub>181</sub> , Z <sub>185</sub> , Z <sub>186</sub> e Z <sub>188</sub> .	42
<b>Figura 6.</b> Tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> ao ácido clorídrico. Cepas Z <sub>194</sub> , Z <sub>297</sub> e Z <sub>397</sub> .	42
<b>Figura 7.</b> Tolerância à bile bovina de <i>Zymomonas mobilis</i> . Cepas CP1, CP2, CP3 e CP4.	47
<b>Figura 8.</b> Tolerância à bile bovina de <i>Zymomonas mobilis</i> . Cepas Z <sub>180</sub> e Z <sub>280</sub> .	47
<b>Figura 9.</b> Tolerância . à bile bovina de <i>Zymomonas mobilis</i> . Cepas Z <sub>181</sub> , Z <sub>185</sub> , Z <sub>186</sub> e Z <sub>188</sub> .	48
<b>Figura 10.</b> Tolerância . à bile bovina de <i>Zymomonas mobilis</i> . Cepas Z <sub>194</sub> , Z <sub>297</sub> e Z <sub>397</sub> .	48
<b>Figura 11.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 em diferentes de pH com bile bovina.	55
<b>Figura 12.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>180</sub> .	56
<b>Figura 13.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>181</sub> .	56

<b>Figura 14.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>1</sub> 85.	57
<b>Figura 15.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>1</sub> 94.	57
<b>Figura 16.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>1</sub> 88.	58
<b>Figura 17.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>1</sub> 86.	58
<b>Figura 18.</b> Avaliação da tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z <sub>2</sub> 80.	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Origem e ano do isolamento das cepas de <i>Zymomonas mobilis</i>	31
<b>Tabela 2</b>	Viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> em meio SSDL acidificado com ácido clorídrico 1N, após 4 horas de contato (% de células viáveis)	39
<b>Tabela 3</b>	Diminuição da viabilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato durante 4 horas com meio SSDL acidificado.	40
<b>Tabela 4</b>	Viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> após 4 horas de contato com diferentes concentrações de bile bovina (p/v) em meio SSDL ( % de células viáveis).	45
<b>Tabela 5</b>	Diminuição da viabilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato durante 4 horas com meio SSDL contendo bile.	46
<b>Tabela 6</b>	Viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 2,5 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.	52
<b>Tabela 7</b>	Diminuição da viabilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 2,5 contendo 0,3 % p/v de bile bovina	53
<b>Tabela 8</b>	Viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 3,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.	53
<b>Tabela 9</b>	Diminuição da viabilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 3,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina	54
<b>Tabela 10</b>	Viabilidade celular de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 4,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina	54
<b>Tabela 11</b>	Diminuição da viabilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> após contato com Meio SSDL pH 4,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina	55

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AN</b>	Agar nutritivo
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CP</b>	Caldo picado
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>IL-1</b>	Interleucina –1
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IFNs</b>	Interferons
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MRS</b>	Meio de Man Rogosa & Sharpe
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p/v</b>	Peso/volume
<b>SAB</b>	Meio Saboraud
<b>SSDL</b>	Meio Standard de Swings & De Ley
<b>TGI</b>	Trato gastro-intestinal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>TNF-<math>\gamma</math></b>	Fator de necrose tumoral-gama
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias



## RESUMO

Desde seu isolamento por Lindner em 1924, *Zymomonas mobilis* tem demonstrado um grande potencial probiótico. Dentre as características para seleção de um probiótico inclui-se sua tolerância ao ácido e à bile, que garante a manutenção da viabilidade durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. Com base nestes critérios, foi objetivado a caracterização da ácido-bile tolerância de treze cepas de *Zymomonas mobilis* isoladas de fermentação alcoólica. Numa primeira etapa foram selecionadas cepas tolerantes ao ácido ou à bile, cuja avaliação foi realizada pela enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), após quatro horas de contato em meio de cultura de SSDL acidificado, com diferentes valores de pH, ou pela incorporação, ao meio, de diferentes concentrações de bile bovina. A segunda etapa constou de uma avaliação da tolerância à 0,3% de bile bovina associada ao meio de SSDL acidificado (pH(s) 2,5; 3,0 e 4,0). Todas as cepas cresceram em meio contendo concentrações iguais ou inferiores à 0,5% de bile bovina ou em pH igual ou superior a 3. Todas as cepas sobreviveram em meio SSDL pH 4,0 contendo 0,3% de bile bovina, após 4 horas de contato, cujos percentuais de viabilidade variaram de 58,61% a 87,66%, dependendo da cepa estudada.

## ABSTRACT

Since its isolation for Lindner in 1924, *Zymomonas mobilis* has been showing a grate probiotic potential. Among the characteristics for probiotic classification, include the acid and bile tolerance, that permit, the viability during its passage across the gastrointestinal tract. Based in this criterion objectify the acid- bile tolerance characterization of thirteen *Zymomonas mobilis* strains isolated from alchoolic fermentation. At first step was selected strains acid or bile tolerant, that evaluation was made for colony formation unit enumeration (CFU/mL), after 4 hours contact in acidified SSDL medium, at different levels of pH or for different bile concentration. The second step was the evaluate of the bile tolerance to 0,3 % p/v associated at acidified SSDL medium (pH(s) 2,5, 3,0 e 4,0). All strains grew in medium with equal or higher pH 3,0. All strains survived in SSDL medium pH 4,0 with 0,3 % bovine bile, after 4 hours contact, which viability ranged from 58,61 % to 87,66 %, depending on studied strain.

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

A microflora intestinal desempenha inúmeras funções no organismo humano, muitas das quais ainda não são conhecidas, mas são consideráveis as evidências do seu desempenho na proteção do organismo contra infecções e outras doenças, bloqueando a colonização de microrganismos patógenos e estimulando a resposta imunológica local.

Composta de inúmeras espécies bacterianas, a microbiota intestinal forma um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (TANNOCK, 1998; BEZKOROVAINY, 2001; KOPP-HOOLIHAN, 2001; O'SULLIVAN, 2001).

Os microrganismos do trato gastrointestinal efetuam diversas atividades enzimáticas, contribuindo para a biossíntese de vitaminas e minerais, participam no metabolismo de substâncias que fazem parte da circulação entero-hepática, facilitando a digestão e induzindo à regularização dos movimentos peristálticos (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota gastro-intestinal, como o uso indevido de antimicrobianos e estresse de qualquer natureza do hospedeiro, poderá permitir a instalação e multiplicação de microrganismos patogênicos. Portanto, é evidente que o equilíbrio da microbiota gastro-intestinal reflete diretamente na saúde do hospedeiro (MILES, 1993; COLLINS et al., 1998; HOLZAPFEL et al., 1998).

Nas sociedades mais dinâmicas e competitivas é observada uma maior incidência de doenças causadas por deficiência ou comprometimento da microflora intestinal, como infecções do trato gastro-intestinal, constipação, síndrome da irritabilidade intestinal, doença inflamatória intestinal, alergias alimentares, diarreia induzida por antibióticos, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, como por exemplo, câncer de cólon-retal (COLLINS et al., 1998; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

A prescrição indiscriminada e o aumento abusivo do uso de antibióticos ocasionaram o surgimento de resistência microbiana. Para combater essa tendência, a Organização Mundial de Saúde (OMS) defende a implementação de estratégias

alternativas de controle de doenças, como a exploração profilática e terapêutica das bactérias probióticas (BENGMARK, 1998; DALY & DAVIS, 1998).

Probióticos têm sido definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que influenciam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989) e, mais amplamente, como microrganismos vivos que ingeridos em certas quantidades além de nutrir, exercem influência benéfica sobre a flora gastro-intestinal (GUARNER & SHAAFSMA, 1998).

A crença nos efeitos benéficos dos probióticos está baseada no conhecimento de que a microflora intestinal provê proteção contra várias doenças (FULLER, 1991; HOLZAPFEL et al., 1998; SAARELA et al., 2000).

A base teórica para a seleção de microrganismos probióticos além de conferir segurança para ser utilizado como alimentos ou medicamentos, inclui aspectos funcionais como: sobrevivência e persistência no trato gastro-intestinal, o que incluiria tolerância ao ácido e à bile; aderência às células intestinais humanas promovendo colonização; produção de antimicrobianos do tipo bacteriocinas; imunoestimulação e atividade contra toxinas de microrganismos patogênicos (COLLINS et al., 1998; SAARELA et al., 2000; BEZKOROVAINY, 2001; O'SULLIVAN, 2001).

Em 1924, Lindner isolou do fermentado do *Agave atrovirens*, uma bactéria que impedia o surgimento da flora putrefativa do intestino. Esta bactéria foi denominada *Termobacterium mobile* e hoje é conhecida como *Zymomonas mobilis* (FALCÃO DE MORAIS, 1982/1983). Clavigero apud Gonçalves de Lima et al. (1970) relataram o uso de “aguamiel” (seiva açucarada fresca de *Agave*, fermentada naturalmente por *Zymomonas mobilis*) pelos astecas, com propósitos terapêuticos e referiram-se ao poder curativo deste contra distúrbios intestinais.

Considerando que, as primeiras barreiras que afetam à seleção de linhagens probióticas são: a alta acidez no estômago e a alta concentração de bile no intestino proximal é imprescindível uma avaliação sobre a tolerância de *Z. mobilis* ao ácido clorídrico e à bile bovina uma vez que, para atingir e desempenhar suas funções probióticas no organismo, este microrganismo deverá resistir ao trânsito gastrintestinal.

## ***2. OBJETIVOS***

---

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Geral

Determinar a tolerância de cepas de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico e à bile bovina

### 2.2 Específicos

- Avaliar a tolerância de treze cepas de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico.
- Avaliar a tolerância de treze cepas de *Zymomonas mobilis* à bile bovina.
- Determinar o efeito causado à população inicial de *Zymomonas mobilis* pelo meio SSDL acidificado, contendo bile bovina.

### ***3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1. PROBIÓTICOS

No princípio do século XX, Elie Metchnikoff verificou que a longevidade dos aldeões búlgaros se devia principalmente à grande quantidade de leite fermentado que consumiam. Ele acabou concluindo que as bactérias responsáveis pela fermentação láctea tinham um efeito benéfico, pois bloqueavam a atividade das bactérias putrefativas do intestino, surgindo assim o termo “probiótico” (GOMEZ-GIL et al., 1998; ROLFE, 2000; SANDERS, 2000).

Fuller (1989), conceituou probióticos ou agentes bioterapêuticos como sendo culturas de microrganismos vivos, que são administrados a humanos e animais, para prevenir e/ou tratar infecções intestinais, urinárias e vaginais, conferindo a estes, efeito benéfico quando consumidos em quantidade adequada (GUARNER & SCHAAFSMA, 1998).

Desde os estudos de Metchnikoff, vários microrganismos com propriedades probióticas (liofilizados ou fermentados) têm sido utilizados, como probióticos a exemplo: os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Bacillus*. Além de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (FULLER, 1989; HOSE & SOZZI, 1991; KAUR, 2002).

##### 3.1.1. Critérios de seleção de probióticos para uso humano

Os critérios para que um microrganismo seja considerado probiótico foram reunidos nos trabalhos publicados por Gomez-Gil et al. (1998) e Dunne et al. (2001) e incluem: aderência e colonização à mucosa epitelial e intestinal; resistência à acidez gástrica e à ação dos sais biliares; ausência de patogenicidade ao hospedeiro; produção de substâncias antimicrobianas; modulação do sistema imune; antagonismo “in vitro” contra microrganismos patógenos; modificação de processos metabólicos, como por exemplo: síntese de vitaminas, redução de aminas no trato gastro-intestinal, degradação de agentes carcinogênicos.

### 3.1.2. Mecanismos de ação dos probióticos

Os probióticos agem por exclusão competitiva, aderindo-se a sítios específicos localizados no epitélio intestinal, diminuindo a colonização por microrganismos patogênicos. O mecanismo de exclusão competitiva não está totalmente esclarecido, entretanto várias pesquisas indicam algumas formas de atuação dos probióticos. No intestino, os microrganismos probióticos realizam uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos microrganismos patogênicos e por consequência, impedem a proliferação destes, devido à produção, principalmente, de ácido lático, tornando o meio impróprio para a multiplicação destes microrganismos; secretam proteínas (bacteriocinas) que têm uma ação inibitória ou destrutiva contra bactérias patógenas; podem estimular a produção de anticorpos e a atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do corpo. Os probióticos aumentam a atividade enzimática no trato gastrointestinal e aumentam a área de absorção do intestino delgado (FOX, 1988; JIN et al, 1997).

Dentre os efeitos benéficos provenientes da utilização de probióticos, diversos autores relatam:

A) *Aumento da tolerância à lactose* – Através da síntese e liberação da lactase pelas bactérias lácticas. Bactérias da flora intestinal (cólon) que não metabolizam lactose, levam à formação de metabólitos que causam cólicas abdominais, flatulência, diarreia e náuseas, o que caracteriza um quadro de intolerância a esse dissacarídeo (VRESE et al, 2001). Bactérias probióticas lactase-positivas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*) são comumente adicionadas a produtos lácteos pasteurizados com a finalidade de aumentar a digestibilidade da lactose presente (GILLILAND & KIM, 1984; PETTOELLO et al., 1989, ROLFE, 2000).

(B) *Redução dos níveis séricos de colesterol* – Os níveis elevados de colesterol são um fator de risco para as doenças cardiovasculares. Existem algumas hipóteses através das quais os probióticos atuam na redução dos níveis de colesterol, entre elas destacam-se: que algumas cepas de lactobacilos podem assimilar moléculas de colesterol (GILLILAND et al, 1985) e que espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* desconjugam enzimaticamente ácidos biliares, aumentando suas taxas de excreção. Para reposição destes ácidos seria utilizada a molécula de colesterol, que é uma molécula

precursora da síntese dos ácidos biliares (DE SMET et al, 1994) O ácido 3-hidroxi-3-metil glutárico presente em leites fermentados inibe a atividade da hidroximetilglutaril-CoA redutase, enzima responsável pela biossíntese do colesterol (MANN, 1977; TAHRI et al, 1997).

C) *Imunomodulação* – Os probióticos são capazes de modular a produção das citocinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa), IFNs(interferons), a proliferação de células mononucleares, a atividade fagocítica de macrófagos e monócitos, autoimunidade, citotoxicidade de células “natural-killer” bem como, a produção de anticorpos (MARTEAU, et al., 1993; FULLER & GIBSON, 1997; MARIN et al, 1997). Os probióticos têm papel importante em indivíduos idosos nos quais, em função da idade, ocorre um declínio das funções imunes, tornando-os mais susceptíveis a doenças infecciosas; o consumo profilático de probióticos neste caso, promoveriam o aumento das respostas imunológicas (ISOLAURI et al, 2001).

D) *Atividade anticarcinogênica* – As bactérias ácido-láticas evitam o surgimento do câncer de cólon através do aumento da resposta imune, ligação e degradação de radicais carcinógenos potenciais, alterações quantitativas e qualitativas da flora intestinal, produção de compostos antimutagênicos e modificação das condições físico-químicas do cólon (MARTEAU, et al., 1993; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

E) *Integridade do trato intestinal* – A utilização de probióticos tem sido recomendada no tratamento de diarreias associadas à administração de antimicrobianos e a infecções por *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e rotavírus, doenças inflamatórias do intestino, além de gastroenterite por *Helicobacter pylori* (ROLFE, 2000).

F) *Hipertensão* – Bactérias probióticas são capazes de promover a proteólise da caseína durante a fermentação do leite, levando à formação de peptídeos bioativos que podem reduzir a pressão sanguínea de hipertensos (SANDERS, 2000).

G) *Profilaxia e tratamento de infecções do trato urogenital* – Os probióticos têm sido utilizados no combate a patógenos associados a infecções urogenitais como: *Candida*, *Trichomonas* ou mesmo infecções mistas, envolvendo *Gardnerella vaginalis* e *Mycoplasma hominis* (SPIEGEL, 1991). As infecções vaginais podem acarretar infertilidade e susceptibilidade a doenças sexualmente transmissíveis (HILLIER et al,

1995; SWEET, 1995). A saúde do trato vaginal está associada à alta população de lactobacilos e um pH < 5 (ESCHENBACH et al, 1989; HILLIER et al, 1992; HAWES et al, 1996). Estudos desenvolvidos por Sanders (2000), sugerem que os lactobacilos têm um papel positivo no controle de infecções vaginais e urinárias, propondo que a administração de preparações probióticas orais ou intravaginais à base de lactobacilos pode ser uma alternativa terapêutica contra estas infecções.

Os efeitos acima descritos dependerão de vários fatores como por exemplo: a escolha da cepa a ser utilizada, duração do consumo e condições fisiológicas do indivíduo. No que diz respeito à segurança relacionada ao uso de probióticos, não existem evidências do envolvimento desses microrganismos em infecções humanas (ISHIBASHI & YAMAZAKI, 2001).

Os alimentos infantis, leites fermentados, produtos lácteos, e preparações farmacêuticas são os veículos para o consumo de probióticos. Destes, o veículo de maior desenvolvimento é o de laticínios, com cerca de 80 produtos comerciais disponíveis no mercado mundial (GOMES & MALCATA, 2000).

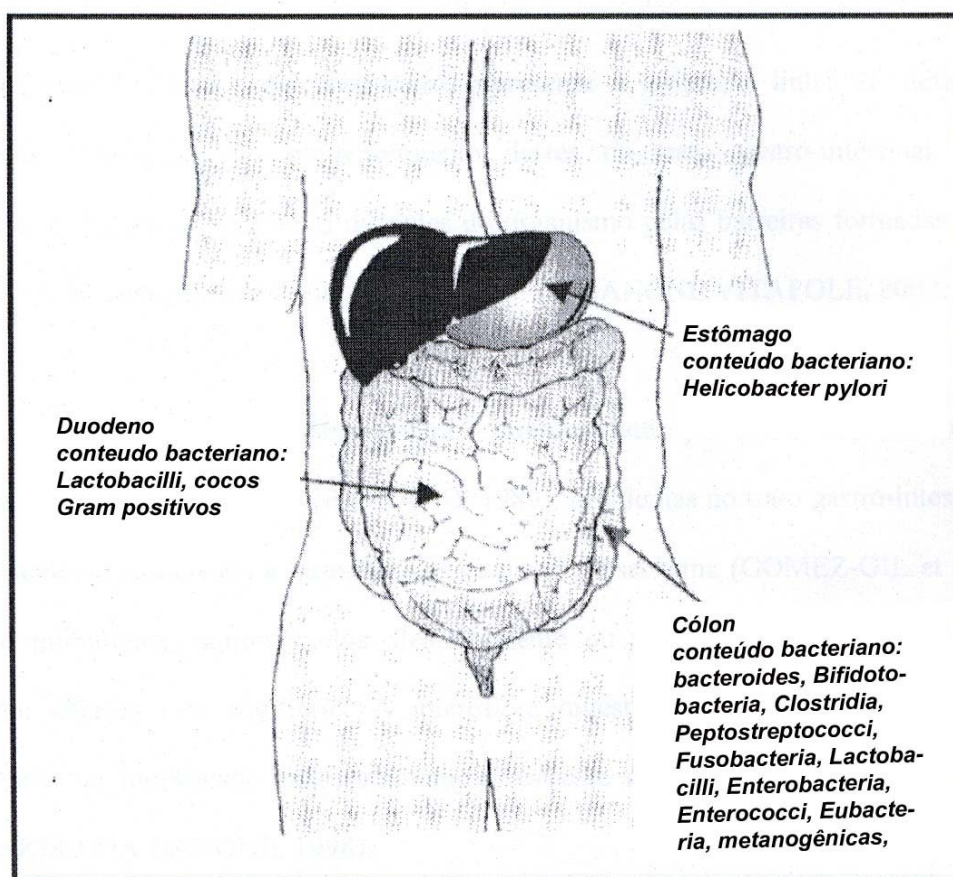
Produtos farmacêuticos probióticos são comercializados mundialmente (FULLER, 1989; ELMER et al, 1996; CANGANELLA et al, 1997). No Brasil, são comercializadas várias preparações probióticas: Floratil – MERCK (*Saccharomyces boulardii* liofilizado); Florax – HEBRON (*Saccharomyces cerevisiae* Fr 1972 em flaconetes); Biovicerin – GEYER (*Bacillus cereus* em flaconetes), Camboacy – FARMAVY (*Lactobacillus acidophilus* fermentado em flaconetes); Leiba – UNIÃO QUÍMICA (*Lactobacillus acidophilus* em flaconetes) (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2000/2001). No Japão são produzidos em torno de 50 produtos lácteos contendo probióticos (GOMES & MALCATA, 2000).

### 3.2. Microbiota gastro-intestinal

Durante a passagem através da vagina o feto humano, antes estéril, adquire microrganismos das floras vaginal e fecal (GIBSON & ROBERFROID, 1995). A flora intestinal é característica de cada espécie animal, sendo adquirida de forma imediata e

de colonização rápida (JERNIGAN et al., 1985; FULLER, 1989; SMORAGIEWICZ et al., 1993).

Estima-se que o estômago apresente um conteúdo bacteriano em torno de  $10^3$ UFC/ml e no duodeno cerca de  $10^4$ - $10^6$ UFC/ml. O cólon humano contém aproximadamente  $10^{14}$  células bacterianas de mais de 400 espécies, as quais totalizam mais que 10 vezes o número de células existentes no organismo humano (NAIDU et al., 1999; MONOGRAFIA DANONE VITAPOLE, 2002). Na figura 1 é mostrada a maior prevalência de espécies bacterianas que habitam o trato intestinal do adulto incluindo bactérias anaeróbicas, como bacterióides, eubactéria, peptoestreptococos, bifidobactéria, lactobacilos, clostrídeos e bactérias anaeróbicas facultativas como enterobactéria ou estreptococos e estafilococos (NAIDU et al., 1999).



**Figura 1:** Distribuição bacteriana no trato digestivo humano (fonte: Monografia Danone, 1998)

O estômago e uma pequena parte do intestino delgado são povoados por baixo número de bactérias devido à acidez das suas secreções (MARSHALL, 1991; FOOKS & GIBSON, 2002;). No homem, a flora estomacal é primariamente composta de bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, como estreptococos. O primeiro segmento do intestino delgado contém uma flora pobre resultante do trânsito de bactérias gástricas (MONOGRAFIA DANONE, 1998). A população e a composição da microflora gastro-intestinal variam nas diferentes zonas do trato e dependem do pH e das exigências do oxigênio. As concentrações mais reduzidas se situam no estômago, onde o pH luminal é o principal fator limitante do crescimento. A mais elevada concentração bacteriana localiza-se no cólon (SALMINEN et al., 1995)

A flora intestinal do hospedeiro representa a primeira linha de defesa contra patógenos, prevenindo o desenvolvimento destes no trato gastro-intestinal. Bactérias patogênicas e viroses são mantidas distantes do organismo pelas barreiras formadas pela pele, mucosa e flora endógena intestinal (MONOGRAFIA DANONE VITAPOLE, 2002).

Interações microbianas representam o principal fator que contribui para a homeostase da flora bacteriana no intestino. Problemas no trato gastro-intestinal estão frequentemente associados à desestabilização deste ecossistema (GOMEZ-GIL et al., 1998). Muitos antibióticos, administrados aleatoriamente ou mesmo utilizados para tratar uma infecção, alteram este equilíbrio. A microflora digestiva balanceada pode ser agredida, deteriorada ou modificada após radioterapia, estresse ou tratamento com antimicrobianos (MONOGRAFIA DANONE, 1998).

Uma série de fatores relacionados ao hospedeiro, a bactéria e ao meio, ajudam a manter a composição e o próprio funcionamento da flora intestinal. A flora intestinal contém uma variedade de diferentes enzimas cujo metabolismo das espécies são extremamente variados, influenciando na saúde ou na doença do hospedeiro (MITSUOKA, 2000).

Dentre os constituintes da flora intestinal, estão os microrganismos de metabolismo putrefativo ou microrganismos patogênicos, os quais formam substâncias nocivas que podem lesar diretamente as células intestinais ou podem ser capazes de colonizar e desencadear doenças (MONOGRAFIA DANONE VITAPOLE, 2002).

A flora intestinal confere proteção contra uma variedade de patógenos entéricos, incluindo *Escherichia coli* (enteropatogênica, enterotoxigênica, êntero-hemorrágica, êntero-invasora e êntero-agregativa), *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas* como também, leveduras, como *Candida albicans* (SALMINEN et al., 1995). Embora os mecanismos de ação não tenham sido completamente esclarecidos, algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a ação protetora desta flora (BEZIRTOGLOU, 1997; FALK et al., 1998; FONS et al., 2000; GUARNER et al., 2002; SCHNEEMAN, 2002; GUARNER & MALAGELADA, 2003) tais como: depleção ou competição por substratos, competição por sítios receptores (exclusão competitiva), geração de um ambiente fisiológico restritivo e produção de substâncias antimicrobianas. Além de atuar diretamente contra os patógenos, a microflora desempenha um importante papel na modulação do sistema imune e do epitélio (MONOGRAFIA DANONE VITAPOLE, 2002).

A idade do indivíduo, estado nutricional, defesas imunológicas, uso de antibióticos, estresse, consumo de álcool, tempo de trânsito do alimento ingerido no trato gastro-intestinal, presença de material no intestino e pH são alguns dos fatores que afetam a composição bacteriana intestinal. A quantidade e o tipo de substratos fermentáveis no intestino também determinam as espécies bacterianas presentes (COLLINS & GIBSON, 1999).

As bactérias utilizadas como probióticos, são comumente liberadas no sistema alimentar, antes de começar sua jornada no trato intestinal inferior. Como tal, as bactérias probióticas devem ser resistentes às enzimas da cavidade oral como por exemplo a lisozima, e devem ter habilidade para resistir ao processo de digestão no estômago e no trato intestinal (BEZKOROVAINY, 2001).

O suco gástrico é um líquido claro, transparente e altamente ácido (PRINZ et al., 1992; LEWIN, 1999). Apresenta-se constituído de 97-99% de água, o restante consiste de mucina e sais inorgânicos, bem como de enzimas digestivas (pepsina e renina) e uma lipase. O ácido clorídrico destrói a maioria dos microrganismos ingeridos pela hidrólise protéica (HELANDER & KEELING, 1993).

A secreção do suco gástrico constitui um mecanismo primário de defesa contra muitos microrganismos ingeridos. De fato, após cirurgias gástricas ou a administração de bloqueadores ácidos, tais como os inibidores da bomba de próton, pode ocorrer a colonização microbiana do estômago (MARTEAU et al., 1993).

O pH ácido normal do estômago protege acentuadamente o indivíduo contra infecções por alguns patógenos entéricos, como por exemplo, o vibrião colérico, quando ingerido em pequeno número. Em condições normais, o *Vibrio cholerae* para ser patogênico para humanos é necessário ingerir de  $10^8$  a  $10^{10}$  microrganismos para que uma pessoa seja infectada e desenvolva a doença, em contraste com a Salmonelose ou a Shigelose, nas quais a ingestão de  $10^2$  a  $10^5$  microrganismos pode induzir infecção (JAWETZ et al., 2000).

O tempo de trânsito do alimento através do estômago humano é de 90 minutos (BERRADA et al., 1991; RENNER, 1991). O estresse da célula bacteriana começa no estômago, cujo pH é menor do que 1,5 (LANKAPUTHRA & SHAH, 1995).

Após a passagem através do estômago, a bactéria entra no trato intestinal superior onde a bile é secretada dentro do intestino. A bile é uma solução de pH alcalino e coloração verde-amarelada produzida pelo fígado. Pode ser hepática, quando armazenada no fígado ou vesicular, quando armazenada na vesícula biliar. É constituída por água, mucina, lecitina, ácidos biliares, pigmentos biliares, colesterol, sais inorgânicos e ácidos graxos (CARULLI et al., 1990; LANZINI & LANZAROTTO, 2000). A concentração de bile no trato gastro-intestinal humano é variável (LANKAPUTHRA & SHAH, 1995). Quando a bactéria alcança o trato intestinal, sua capacidade de sobreviver depende de sua resistência à bile (GILLILAND et al., 1984; GILLILAND, 1987). A bile entra na seção duodenal do intestino delgado e reduz a sobrevivência das bactérias. Isto provavelmente se deve ao fato de que toda bactéria tem sua membrana celular constituída de lipídios e ácidos graxos que são susceptíveis à destruição pelos sais biliares (CARULLIN et al., 2000).

Depois de sobreviver a este ambiente hostil, o microrganismo coloniza a mucosa do trato intestinal grosso. Assim, cepas microbianas selecionadas para utilização como bactérias probióticas devem ser capazes de tolerar a acidez gástrica e os sais biliares por, pelo menos, 90 minutos, colonizar o epitélio e crescer (CONWAY, et al., 1987).

Os probióticos devem se adaptar aos diferentes micro-ambientes do TGI para serem capazes de desempenhar sua função protetora (BRASSART & SCHIFFREN, 1997).



Para sobreviver e colonizar o TGI, a bactéria probiótica precisa expressar alta tolerância às condições ácidas e à bile e ter habilidade de aderir a mucosa intestinal (LEE & SALMINEN, 1995; KIRJAVAINEN et al., 1998). Antes de atingir o trato intestinal, a bactéria probiótica deve sobreviver primeiro ao trânsito através do estômago (HENRIKSSON et al., 1999).

Vários são os pesquisadores que vêm estudando a capacidade de microorganismos probióticos de tolerar altas concentrações de ácido clorídrico e sais biliares tais como: ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, tauro- e glico- colatos. (GILLILAND et al., 1984; CONWAY, et al., 1987; HOLCOMB et al., 1991; IBRAHIM & BEZKORVAINY, 1993).

Dunne et al. (2001) avaliaram o grau de resistência ao ácido clorídrico de cepas bacterianas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isoladas do íleo humano. A sobrevivência foi inicialmente avaliada pelo contato de lactobacilos e bifidobactéria com o meio de Man Rogosa & Sharpe (MRS) acidificado com ácido clorídrico, cujos valores de pH estavam enquadrados entre 2,0 e 3,4, e concluíram que muitos dos microorganismos eram tolerantes ao ácido, portanto poderiam transitar o estômago humano com sucesso.

Jacobsen et al. (1999) avaliaram a resistência ao ácido de quarenta e sete cepas de *Lactobacillus* spp. em meio MRS ajustado em pH 2.5, após 4 horas de contato, incubados a 37°C. Destas, vinte e nove cepas (61,70%) foram tolerantes ao ácido clorídrico.

Em trabalho desenvolvido por Dunne et al. (2001), sobre a resistência de lactobacilos e bifidobactérias a diferentes tipos de bile, em concentrações que variaram de 0,3 a 7,5%. Eles concluíram que essa resistência estava relacionada ao gênero ou mesmo a espécie microbiana estudada independentemente do tipo de bile testada, e que todas as bactérias analisadas poderiam crescer em concentrações fisiológicas de bile humana.

### 3.3. *Zymomonas mobilis*

*Z. mobilis* são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, existindo algumas linhagens que são obrigatoriamente anaeróbias. Morfologicamente, apresentam-se na forma de bastonetes curtos e grossos, isolados ou aos pares, e mais raramente, em cadeias de poucas unidades, medindo de 2 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,5 µm de largura. Geralmente são móveis, apresentando de 1 a 4 flagelos polares, e não esporulantes. ( GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; DADDS; & MARTIN, 1973; SWINGS & DE LEY, 1977; FALCÃO DE MORAIS, 1982/1983; HOLT et al., 1994).

Barker e Hillier, em 1911, foram os primeiros a isolar *Zymomonas* quando estudavam a “doença da sidra”, mas por não terem atribuído um binômio latino ao microorganismo, a descrição não foi reconhecida (SWINGS & DE LEY, 1977). Apenas em 1924, quando Lindner isolou esta mesma bactéria de seiva fermentada da *Agave atrovirens* é que se pode creditar a esta bactéria a denominação de *Termobacterium mobile*. Atualmente, segundo a classificação de Swings & De Ley (1977) o gênero *Zymomonas* é reconhecido, considerando uma só espécie: *Zymomonas mobilis*, com duas subespécies: *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* e a *subsp. pomaci* (FALCÃO DE MORAIS, 1982/1983; HOLT et al., 1994).

Cepas de *Zymomonas mobilis* foram isoladas de ambientes açucarados os mais diversos: vinhos de maçã e de pêra, na Europa; seiva de *Agave* fermentada, no México; cerveja deteriorada, nas Ilhas Britânicas; seivas de diversas palmas, na África, Ásia e Américas; caldo de cana fermentado no Brasil. O isolamento da *Z. mobilis* a partir destes fermentados é bastante difícil, devido à presença de leveduras, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Leuconostoc* (FALCÃO DE MORAIS, 1982/1983).

Em meio sólido à base de glicose, as colônias de *Z. mobilis* apresentam-se lenticulares com bordos regulares, de coloração branca ou creme e com 1 a 2 mm de diâmetro, após 2 dias de incubação a 30°C (SWINGS; DE LEY, 1977; HOLT et al., 1994). Em meio líquido, há um crescimento abundante a temperatura entre 25°C e 42°C, a cepa CP1 tem capacidade de fermentar mesmo a 42°C em meio de SCHREDER, apreciável tanto pela alta densidade celular dispersa quanto pelo

sedimento flocoso (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970, GONÇALVES DE LIMA et al., 1972).

Do ponto de vista nutricional, são microrganismos quimiotróficos e necessitam principalmente de nitrogênio, fósforo e enxofre para suas funções metabólicas normais (DADDS & MARTIN, 1973; FALCÃO DE MORAIS, 1983), desenvolvendo-se bem em meios contendo apenas glicose e extrato de levedura. A glicose e a frutose são utilizadas por todas as linhagens, enquanto que sacarose, apenas por algumas (SWINGS & DE LEY, 1977; HOLT et al., 1994).

Do ponto de vista bioquímico, a *Zymomonas mobilis* utiliza a via de Entner-Doudoroff para fermentar a glicose, produzindo etanol e CO<sub>2</sub>, além de acetoína, lactato, glicerol e dihidroxicetona, apesar desta ser uma via característica de microrganismos aeróbios estritos (GIBBS & DE MOSS, 1954; DAWES et al., 1966; FALCÃO DE MORAIS, 1982/1983). Em meios à base de sacarose, além de etanol, há produção de levana (polímero de frutose), sorbitol, manitol e ácido glucônico (DAWES et al., 1966; DADDS & MARTIN, 1973).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido desenvolvidos, em todo o mundo, com o objetivo de explorar o potencial da *Z. mobilis* para a produção de etanol em larga escala, a exemplo dos países, como Austrália, Canadá, Estados Unidos e Japão (MCLELLAN et al., 1999; SHANE et al., 2000).

### **3.3.1. Atividade antagonista da *Zymomonas mobilis***

A partir do pulque, fermentado leitoso produzido do sumo de *Agave atrovirens*, que Lindner isolou a *Z. mobilis*. Esta bebida era utilizada na prevenção e cura de infecções intestinais desde 1000 dC pelos astecas, além de ocupar destacado papel nos rituais religiosos (GONÇALVES DE LIMA, 1975).

Gonçalves de Lima et al. (1970; 1972; 1975) demonstrou a notável atividade antagonista da *Z. mobilis* contra numerosas espécies de bactérias e fungos.

Motivados pelas propriedades medicinais de *Z. mobilis* reportadas por vários pesquisadores, médicos do Recife, principalmente gastroenterologistas, trataram

pacientes de colites crônicas e outros distúrbios entéricos ou urinários causados por microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais (PAULA GOMES, 1959).

Wanick et al. (1970) e Wanick & Silva (1971) demonstraram a utilização dos cultivos líquidos de *Z. mobilis* no tratamento de infecções ginecológicas causadas por *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Souza & Souza (1973) mostraram que obtiveram 86 % de cura ao tratarem, com a cultura de *Z. mobilis* pacientes portadores de colpites e vulvovaginites causadas por *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus sp.*

Lopes et al. (1980) utilizaram doses orais que variaram entre 150 a 300mL da cultura de *Zymomonas mobilis*, 3 vezes ao dia por 5 a 10 dias, no tratamento de doenças entéricas causadas por *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis* e por microrganismos Gram positivos. Ao final do tratamento, foram observados o desaparecimento dos sintomas e a completa erradicação das bactérias patogênicas. Em 1997, Bacelar avaliou a ação da cultura de *Zymomonas mobilis*, na inibição do desenvolvimento da peritonite em camundongos, bloqueando a formação de abscessos e mortalidade e obtendo uma redução da mortalidade de 60 % para 33 %.

Jales et al. (1999) e Vasconcelos (2001) observaram quantitativamente o efeito antimicrobiano da cultura e do liófilo de *Zymomonas mobilis* sobre *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente.

Calazans et al. (2000) observaram que a levana produzida por diferentes linhagens ou por uma mesma linhagem de *Zymomonas* apresentavam ação antitumoral que variava com o peso molecular do polissacarídeo.

Santos et al. (2001), observaram uma redução da quantidade de *Schistosoma mansoni*, vermes adultos, em camundongos infectados, após tratamento oral com cultura de *Zymomonas mobilis*, bem como o aumento dos níveis de interferon gama (INF  $\gamma$ ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), no sangue de dez indivíduos sadios, após estimulação com esta mesma cultura.

## ***4. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Zymomonas mobilis* AO ÁCIDO CLORÍDRICO E A BILE BOVINA

#### 4.1.1 Microrganismos

Para este estudo foram utilizadas treze cepas de *Zymomonas mobilis*, identificadas pelas siglas: **CP1; CP2; CP3; CP4; Z<sub>1</sub>80; Z<sub>2</sub>80; Z<sub>1</sub>81; Z<sub>1</sub>85; Z<sub>1</sub>86; Z<sub>1</sub>88; Z<sub>1</sub>94; Z<sub>2</sub>97 e Z<sub>3</sub>97**, gentilmente cedidas pelo Prof. José Otamar Falcão de Moraes que as isolou durante o processo fermentativo para produção de etanol e as identificou. A tabela 1 mostra a origem e o ano de isolamento destas cepas.

##### 4.1.1.1 Meios de Cultura

- Meio líquido de SSDL (SWINGS & DE LEY, 1977), utilizado na manutenção das culturas; na pré-fermentação de *Zymomonas mobilis* nos ensaios com o ácido clorídrico e a bile bovina;
- Meio líquido de SCHEREDER modificado, utilizado na padronização do inóculo e na fermentação de *Z. Mobilis* (MAGALHÃES-NETO, 1959; LOPES, 1980);
- Meio sólido e semi-sólido de SSDL, utilizado para a obtenção de cultivos de *Z. mobilis* e enumeração das UFC/mL após contato com o ácido clorídrico e bile bovina.

**Tabela 1:** Origem e ano do isolamento das linhagens de *Zymomonas mobilis*

Linhagens	Origem		
	Substrato	Ano	Local
<i>Zymomonas mobilis</i> CP1	Caldo de cana picado	1970	Recife
<i>Zymomonas mobilis</i> CP2	Caldo de cana picado	1970	Recife
<i>Zymomonas mobilis</i> CP3	Caldo de cana picado	1970	Recife
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	Caldo de cana picado	1970	Recife
<i>Zymomonas mobilis</i> Z180	Caldo de cana	1980	Usina Massauassu, PE
<i>Zymomonas mobilis</i> Z280	Caldo de cana	1980	Usina não identificada, SP
<i>Zymomonas mobilis</i> Z181	Caldo de cana	1981	Usina Bulhões, Jaboatão, PE
<i>Zymomonas mobilis</i> Z185	Bagaço de cana	1985	Jaboatão, PE
<i>Zymomonas mobilis</i> Z186	Caldo de cana + melaço	1986	Goiana, PE
<i>Zymomonas mobilis</i> Z188	Caldo de cana	1988	Vicência, PE
<i>Zymomonas mobilis</i> Z194	Mosto de melaço	1994	Usina Porto Rico, AL
<i>Zymomonas mobilis</i> Z297	Caldo de cana	1997	Destilaria Miriri, Santa Rita, PB
<i>Zymomonas mobilis</i> Z397	Caldo em fermentação	1997	Destilaria Japungu, Santa Rita, PB

#### **4.1.1.2 Manutenção das Culturas de *Zymomonas mobilis***

As cepas de *Z. mobilis* foram mantidas sob refrigeração a 4°C em meio de SSDL, cuja composição em g/L, é a seguinte: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0 (pH 6,5).

Subcultivos foram efetuados a cada três meses para meio líquido de SSDL e incubados durante 48 horas a 35°C.

#### **4.1.1.3 Pré-fermentação**

A pré-fermentação foi desenvolvida em meio de SSDL, modificado (MAGALHÃES-NETO, 1959; LOPES, 1980) cuja composição do meio em g/L é a seguinte: glicose 20,0; extrato de levedura 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0; MgSO<sub>4</sub> . 7.H<sub>2</sub>O 0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 (pH 7,0 ± 0,2). As soluções de cada componente do meio foram preparadas e autoclavadas, separadamente, a 120°C por 15 minutos

#### **4.1.1.4 Padronização do Inóculo de *Zymomonas mobilis***

Após a pré-fermentação foi realizada a padronização dos inóculos das cepas de *Zymomonas mobilis* pela transferência de 10% (v/v) da cultura crescida no meio SSDL para um meio novo de SSDL, e incubados à 35°C durante 48 horas.

#### **4.1.1.5 Fermentação**

As fermentações foram iniciadas pela transferência das culturas do meio SSDL para o meio de SCHEREDER numa proporção de 10% (v/v) do volume inicial de fermentação. Essas culturas foram incubadas durante 24 horas a 35°C.

#### **4.1.1.6 Enumeração das Culturas Padronizadas de *Zymomonas mobilis***

Uma alíquota de 0,5 mL de cada uma das culturas de *Z. mobilis* padronizadas foi diluída de forma seriada de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> em tubos contendo 4,5 mL de água destilada e esterilizada. Um mililitro de cada uma das diluições foi incorporado a 9 mL de meio



semi-sólido de SSDL e vertidos sobre uma placa que já contém 8 mL de meio sólido de SSDL. As placas semeadas foram incubadas a 35°C, durante 72 horas. Após incubação, foi realizada a enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

#### **4.1.1.7 Teste de Pureza**

As culturas foram crescidas em meio de Saboraud e Agar nutritivo (AN) para verificar se ocorria o crescimento de fungos ou bactérias contaminantes, respectivamente.

#### **4.1.2. Avaliação da Tolerância das Culturas de *Zymomonas mobilis* ao Ácido Clorídrico**

A avaliação da tolerância das culturas de *Zymomonas mobilis* foi determinada segundo o método descrito por Jacobsen et al (1999), e está esquematizada nas figuras 2<sup>a</sup> e 2B.

Para esta avaliação, o pH do meio líquido SSDL foi previamente ajustado com ácido clorídrico 1N. Desta forma, foi obtida uma série de tubos com meio SSDL com valores de pH ajustados à 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0.

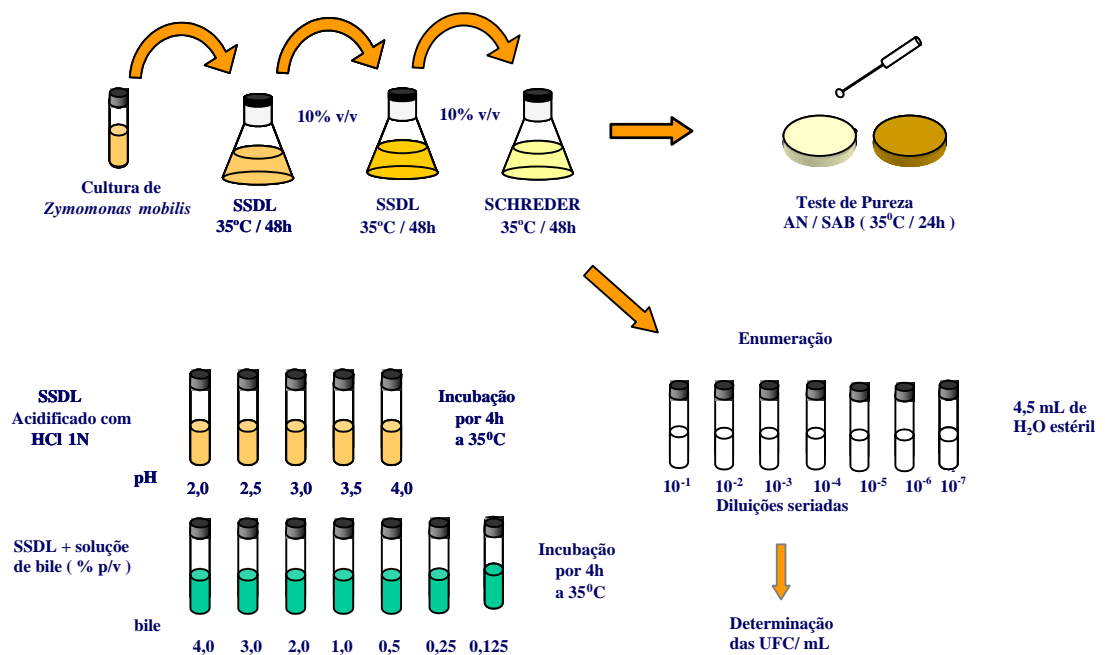
Dois mililitros das culturas de *Z. mobilis* contendo  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL, foram postos em contato por quatro horas com 14 mL do meio líquido de SSDL acidificado e incubado por 4 horas a 35°C. Após a incubação, uma alíquota de 0,5 mL de cada cultura foi diluída seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  e um mililitro de cada uma das diluições foi incorporado a 9 mL de meio semi-sólido de SSDL e vertidos sobre uma placa contendo 8 mL de meio sólido de SSDL. As placas foram homogeneizadas, colocadas em superfície plana até total solidificação e incubadas a 35°C, durante 72 horas. A leitura foi realizada pela enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC) de cada uma das culturas de *Z. mobilis*.

#### **4.1.3. Avaliação da Tolerância das Culturas de *Zymomonas mobilis* à Bile Bovina**

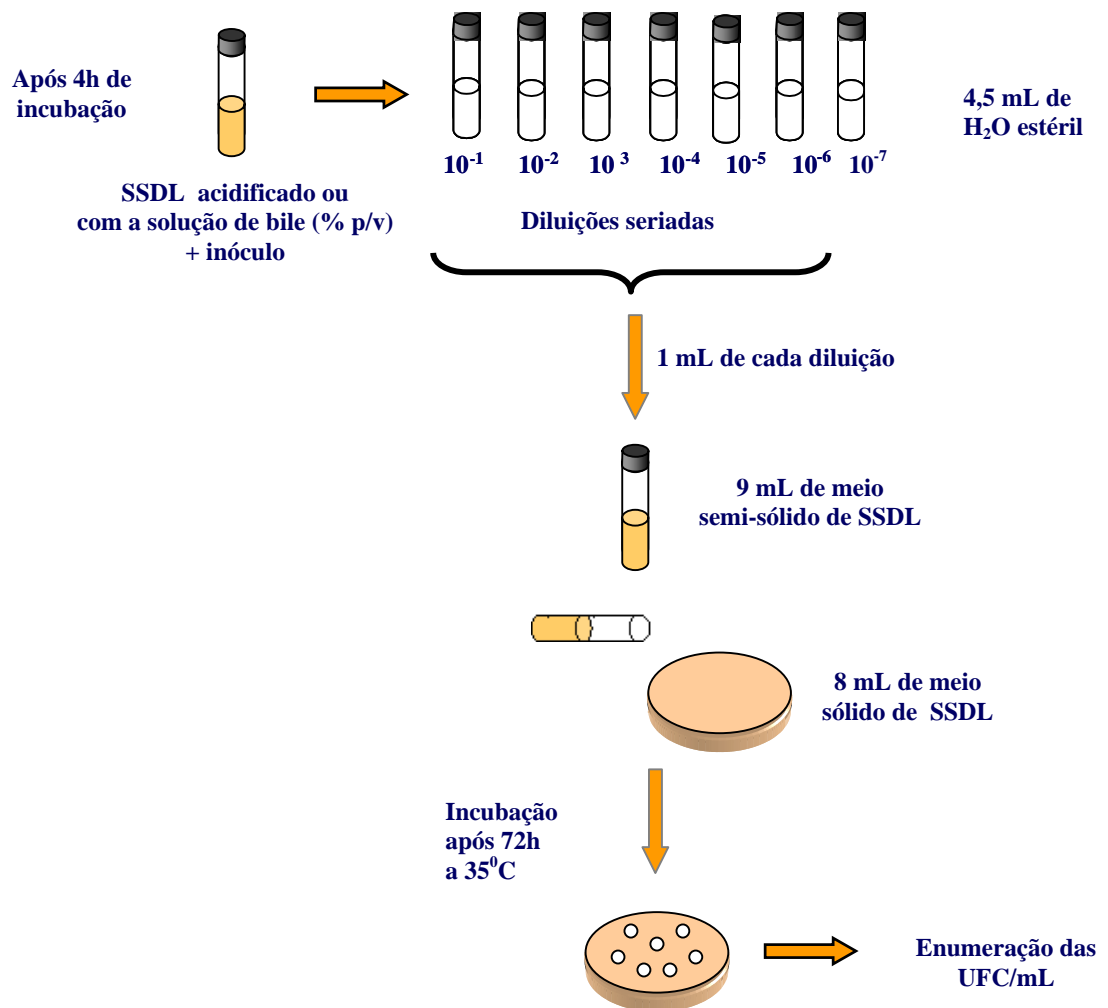
A tolerância das culturas de *Zymomonas mobilis* à bile bovina foi determinada pelo método descrito por Jacobsen et al. (1999), e está esquematizada nas figuras 2A e 2B.

A bile bovina foi pesada e solubilizada em água destilada de modo a obter soluções com concentrações de 40 %; 30 %; 20 %; 10 %; 5 %; 2,5 % e 1,25 % p/v. Estas soluções foram autoclavadas à 121°C, por 15 minutos. Um mililitro de cada uma destas soluções foi posto em contato, por quatro horas a 35°C, com 9mL de cada uma das culturas de *Zymomonas mobilis* em meio líquido de SSDL.

Após o contato, as culturas foram diluídas seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  e um mililitro de cada uma delas foi incorporado a 9mL do meio semi-sólido de SSDL. Em seguida, este conteúdo foi vertido sobre placas que continham 8mL do meio sólido de SSDL. Estas placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas. A leitura foi realizada após incubação, pela enumeração das UFC/mL de *Zymomonas mobilis*.



**Figura 2A.** Esquema da avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico e à bile bovina.



**Figura 2B.** Esquema da avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico e à bile bovina.

#### 4.2 Determinação da Viabilidade Celular de *Zymomonas mobilis* em Meio SSDL, Acidificado e Contendo Bile Bovina

Para esta análise foram escolhidas cinco cepas, as mais tolerantes ao ácido clorídrico e à bile bovina, isoladamente.

A sobrevivência destas cepas foi avaliada após contato com SSDL acidificado (pH 2,5; 3,0; 4,0), acrescido de uma solução de concentração igual a 0,3 % (p/v) de bile.

Um mililitro das culturas padronizadas de *Zymomonas mobilis* foi incorporado a 9mL do meio líquido de SSDL acidificado, contendo bile bovina. Estas culturas foram incubadas por 4 horas. Em intervalos regulares de 1 hora, alíquotas de 0,5 mL de cada cepa de *Zymomonas mobilis* foram retiradas e diluídas seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Um mililitro de cada uma das diluições, foi adicionado a 9mL de meio semi-sólido de SSDL e vertidos sobre uma placa contendo 8 mL do meio sólido de SSDL. As placas foram homogeneizadas e postas em superfície plana até total solidificação. Em seguida, as placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. A leitura foi realizada pela enumeração das colônias viáveis de *Zymomonas mobilis* e expressa em  $\log_{10}\text{UFC/mL}$

## ***5. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. AVALIAÇÃO DA ÁCIDO TOLERÂNCIA

Os efeitos da tolerância ao ácido clorídrico sobre a viabilidade de treze cepas de *Zymomonas mobilis* estão representados na tabela 2 e 3 e nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Todas as cepas de *Zymomonas mobilis* testadas foram sensíveis ao pH 2,0, após um contato por 4 horas.

*Zymomonas mobilis* CP4 foi a cepa mais sensível ao pH 2,5, dentre as cepas mais tolerantes a este pH. Uma diminuição de  $5,75 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,28$ , correspondente a 37,83 % da sua viabilidade celular inicial foi observada. A cepa mais tolerante foi Z<sub>194</sub>, a qual apresentou um percentual de sobrevivência de 71,73 % , correspondente a uma queda de  $2,53 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  do seu inóculo original. Apenas seis das treze cepas testadas, ou seja, cerca de 46 %, foram resistentes ao pH 2,5. Uma ordem crescente de tolerância ao ácido clorídrico foi estabelecida para as cepas estudadas, assim: CP4 < Z<sub>288</sub> < Z<sub>180</sub> < Z<sub>181</sub> < Z<sub>186</sub> < Z<sub>194</sub>.

Todas as cepas de *Zymomonas mobilis* foram tolerantes aos pH 3,0; 3,5 e 4,0.

As cepas CP3 e Z<sub>185</sub> foram as mais sensíveis ao pH 3,0, com percentuais de sobrevivência de 34,55 % e 40,80 % e diminuição de  $5,87 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,46$  e  $5,15 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,063$ , respectivamente.

*Zymomonas mobilis* Z<sub>186</sub> foi a mais tolerante ao pH 3,5 com percentuais de sobrevivência de 83,81 %.

*Zymomonas mobilis* Z<sub>185</sub> foi a mais sensível ao pH 4,0, com um percentual de sobrevivência equivalente à 59,65 % e um decréscimo de  $3,51 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,05$  quando comparado ao inóculo original. *Zymomonas mobilis* Z<sub>188</sub> foi a cepa mais resistentes ao pH 4 cujo decréscimo do inóculo original foi de  $0,67 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,07$  e percentual de sobrevivência de 92,93 %.

Estes resultados corroboram aos de Carvalho (2003), que avaliou previamente, o perfil de tolerância de cinco cepas de *Zymomonas mobilis* ( Z<sub>180</sub>, Z<sub>181</sub>, Z<sub>188</sub>, Z<sub>397</sub> e CP1) ao ácido clorídrico e verificou que 100 % delas também eram resistentes em pH 3,0.

É conhecida a grande variabilidade da tolerância de microrganismos probióticos a ambientes de extrema acidez.

O'Sullivan (2001) e Tuomola et al., (2001) afirmaram que microrganismos isolados durante o processo fermentativo, participam de uma pré-seleção de viabilidade, pois, a presença de ácidos orgânicos e etanol servem como agentes inibidores e apenas àquelas cepas verdadeiramente ácido tolerantes serão capazes de sobreviver neste ambiente.

Ehrmann et al. (2002), em seu trabalho sobre a ácido-tolerância de cepas de lactobacilos isoladas do trato intestinal de patos, relacionaram a anátomo-fisiologia intestinal destes animais à sobrevivência de 100 % das cepas estudadas em valores pH compreendidos entre 2,0 e 3,0.

Diversos são os trabalhos que descrevem o isolamento e determinam a viabilidade de microrganismos probióticos, principalmente, dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* em ambientes acidificados. A variação do tempo de exposição destes microrganismos a um pH ácido influencia diretamente na viabilidade celular e este parâmetro é influenciado pelo microrganismo estudado ( PORCHART et al., 1992; CHOU & WEIMER, 1999; JACOBSEN et al., 1999, DUNNE et al., 2001).

Esta conclusão também é aceita para bactérias lácticas formadoras de esporos (*Bacillus* e *Sporolactobacillus*). Mesmo produzindo estruturas de resistência, os esporos, Hyronimus et al.,(2000) observaram que a viabilidade de cepas de *Bacillus* e *Sporolactobacillus* decrescia de 53 % e 45 %, para o pH 2,5 e 3,0, respectivamente, após 6 horas de contato.

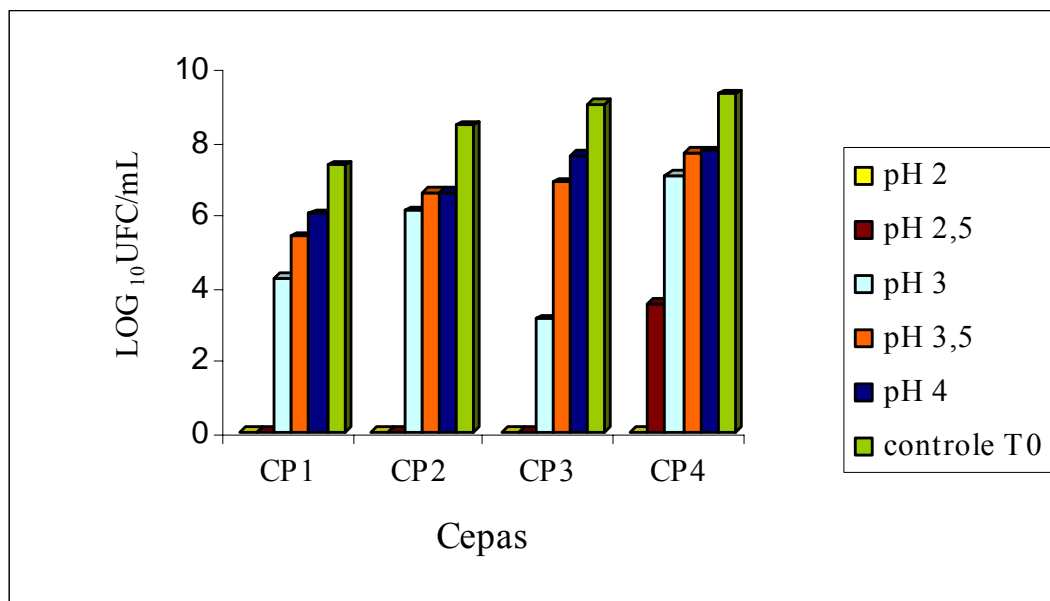
**Tabela 2.** Percentual de viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* em meio SSDL acidificado com ácido clorídrico 1N, após 4 horas de contato ( % de células viáveis).

Linhagens	pH				
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
<i>Zymomonas mobilis</i> CP1	0	0	57,67%	73,15%	81,78%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP2	0	0	71,81%	77,76%	78,24%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP3	0	0	34,55%	81,21%	90,24%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	0	37,83%	76,10%	82,81%	83,24%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	0	0	82,23%	85,91%	92,51%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	0	48,20%	75,89%	79,37%	88,87%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	57,75%	75,90%	82,72%	83,82%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	0	0	40,80%	51,72%	59,65%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	0	61,71%	83,81%	87,61%	90,40%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	0	50,10%	82,27%	82,17%	92,93%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	0	71,73%	72,73%	86,70%	87,93%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 97	0	0	79,20%	79,88%	82,61%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>3</sub> 97	0	0	71,58%	83,83%	88,54%

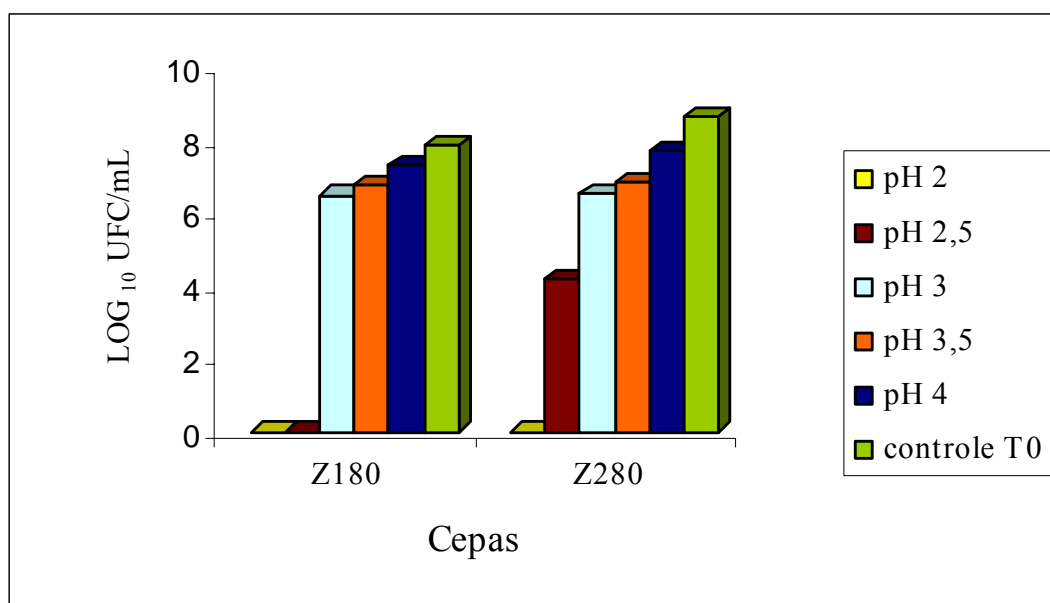


**Tabela 3:** Diminuição da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato durante 4 horas com meio SSDL acidificado. Expresso em  $\log_{10}$  das unidades formadoras de colônias por mililitro em função do tempo(h).

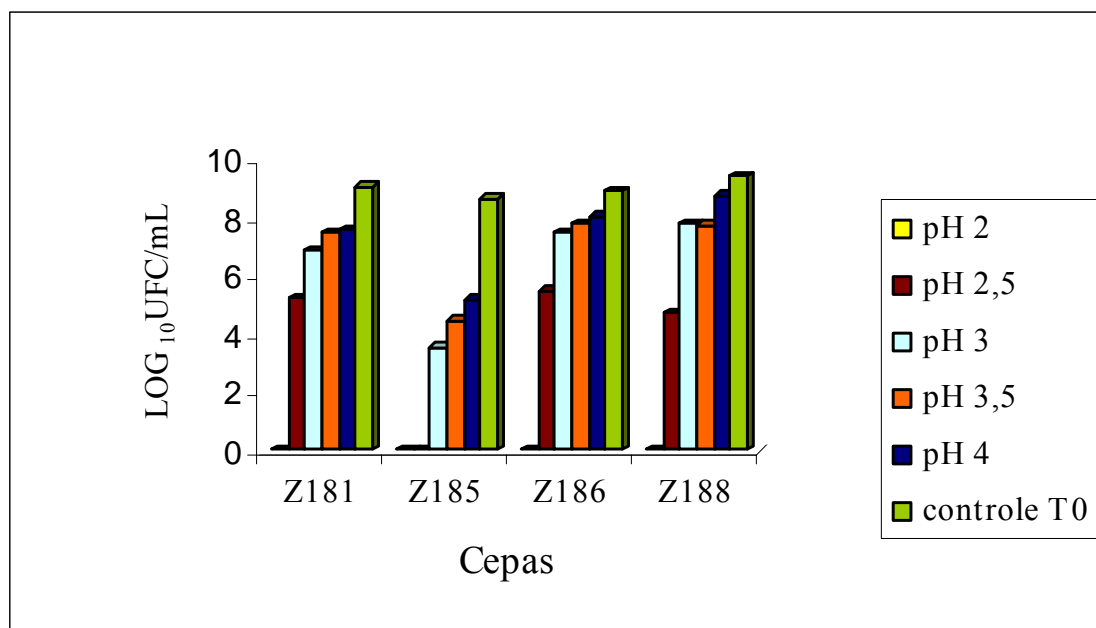
Linhagens	pH				
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
<i>Zymomonas mobilis</i> CP1	0	0	3,09± 0,32	1,96± 0,41	1,33± 0,14
<i>Zymomonas mobilis</i> CP2	0	0	2,37± 0,22	1,87± 0,31	1,83± 0,15
<i>Zymomonas mobilis</i> CP3	0	0	5,87± 0,46	2,14± 0,50	1,38± 0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	0	5,75± 0,28	2,21± 0,26	1,59± 0,21	1,55± 0,29
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	0	0	1,4± 0,27	1,11± 0,25	0,59± 0,41
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	0	4,47± 0,67	2,08± 0,12	1,78± 0,12	0,96± 0,08
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	3,84± 0,07	2,19± 0,26	1,57± 0,33	1,47± 0,27
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	0	0	5,15± 0,06	4,2± 0,7	3,51± 0,05
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	0	3,43± 0,13	1,45± 0,48	1,11± 0,56	0,86± 0,21
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	0	4,73± 0,14	1,68± 0,25	1,69± 0,14	0,67± 0,07
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	0	2,53± 0,1	2,44± 0,1	1,19± 0,19	1,08± 0,02
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 97	0	0	1,83± 0,19	1,77± 0,04	1,53± 0,09
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>3</sub> 97	0	0	1,81± 0,28	1,03± 0,77	0,73± 0,44



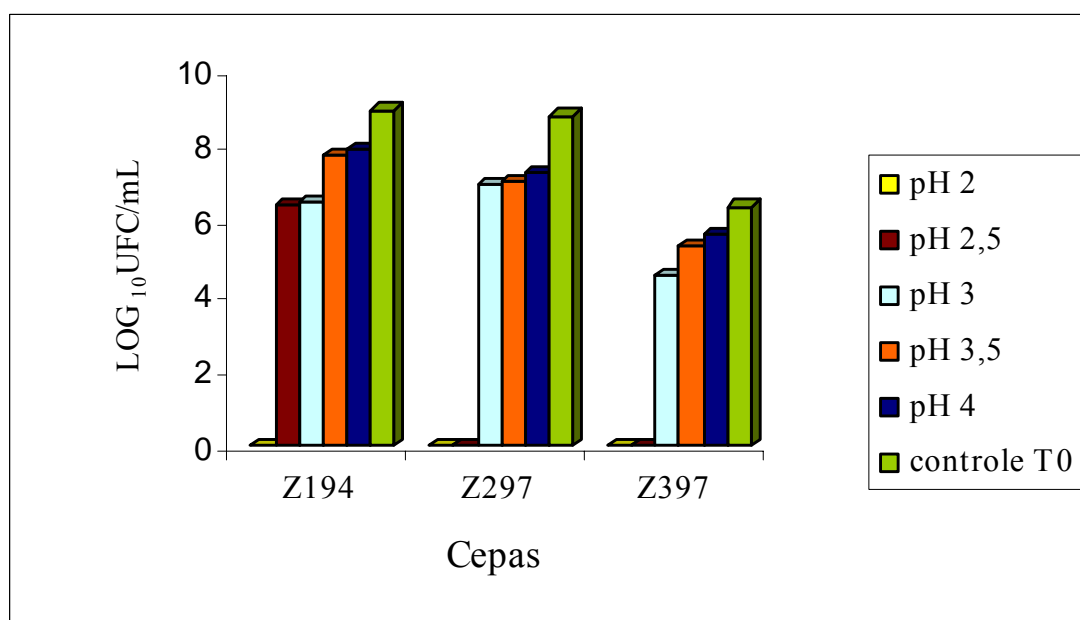
**Figura 3.** Tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico. Cepas CP1, CP2, CP3 e CP4.



**Figura 4.** Tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico. Cepas Z<sub>180</sub> e Z<sub>280</sub>



**Figura 5.** Tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico. Cepas Z<sub>181</sub>, Z<sub>185</sub>, Z<sub>186</sub> e Z<sub>188</sub>.



**Figura 6.** Tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico. Cepas Z<sub>194</sub>, Z<sub>297</sub> e Z<sub>397</sub>.

## 5.2. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À BILE BOVINA

Os resultados obtidos sobre a viabilidade de treze cepas de *Zymomonas mobilis* no que se refere à tolerância à bile bovina estão representados nas tabelas 4 e 5 e nas figuras 7, 8, 9 e 10.

Todas as cepas de *Zymomonas mobilis* cresceram em concentrações de bile bovina iguais ou inferiores a 0,5 % p/v.

Dentre as cepas estudadas, *Zymomonas mobilis* Z<sub>397</sub> e CP2 apresentaram-se como as mais sensíveis, cuja viabilidade celular foi observada apenas em concentrações iguais ou inferiores a 0,5 % p/v. Estas culturas apresentaram uma taxa de sobrevivência de 39,71 % e 31,74 % , e decréscimo do inóculo de  $3,84 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,33$  e  $5,74 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,02$ , respectivamente, para uma concentração de bile no meio SSDL de 0,5% (p/v).

*Zymomonas mobilis* cepas Z<sub>280</sub>, CP1 e CP3 sobreviveram em concentrações biliares iguais ou inferiores a 1 %, 2 % e 3 % p/v, respectivamente.

A cepa Z<sub>280</sub> foi sensível a concentrações superiores a 1 % p/v de bile bovina, apresentando um percentual de sobrevivência de 37,07 % e diminuição de  $5,43 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,27$ .

*Zymomonas mobilis* cepa CP1 apresentou crescimento apenas a partir da concentração biliar de 2 % p/v com 35,61 % de sobrevivência e diminuição de  $4,7 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$ . Enquanto que, *Zymomonas mobilis* cepa CP3 apresentou crescimento a partir da concentração biliar de 3%p/v, com sobrevivência de 28,53 % e diminuição do seu inóculo inicial de  $6,41 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,37$ .

A partir dos resultados obtidos foi criada uma ordem decrescente para classificar as cepas de *Zymomonas mobilis* quanto a sua sensibilidade à concentração de bile bovina de 4 % p/v: Z<sub>188</sub> < Z<sub>297</sub> < Z<sub>185</sub> < Z<sub>186</sub> < Z<sub>194</sub> < CP4 < Z<sub>181</sub> < Z<sub>180</sub>.

A cepa Z<sub>188</sub> foi a mais sensível, apresentando percentual de sobrevivência de 34,49 % e redução de  $6,21 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,38$ , enquanto que a cepa Z<sub>180</sub> mostrou a maior tolerância dentre as cepas testadas com sobrevivência de 70,98 %, com diminuição equivalente a  $2,24 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,29$ .

O estudo da tolerância à bile de cepas de *Zymomonas mobilis* revelou que

61,53 % destas foram tolerantes à concentrações inferiores ou iguais a 4 % p/v de bile bovina.

A sobrevivência destes microrganismos à bile bovina nos habilita classificar estas cepas como de alto grau de tolerância, principalmente quando comparamos nossos resultados aos trabalhos realizados por Jacobsen et al., (1999), Ehrmann et al., (2002) e Dunne et al., (2001), nos quais a tolerância à bile dos microrganismos estudados situou-se em torno de 0,3 % p/v.

Estes resultados não corroboram aos de Torres et al.(2003), que observou uma tolerância de *Zymomonas mobilis* CP1 à concentrações iguais ou inferiores a 0,125% p/v de bile bovina, após incubação por 72 horas. O tempo de contato influenciou diretamente na tolerância quando comparamos os resultados.

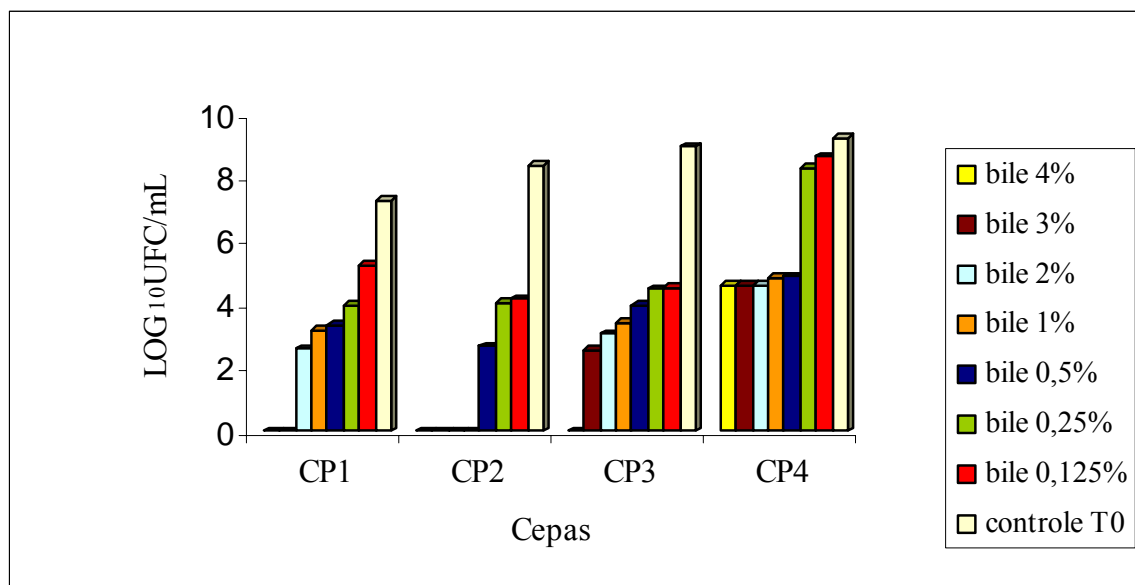
A tolerância à bile é uma importante característica para a seleção de microrganismos probióticos como lactobacilos, microorganismos que sobrevivem e crescem no trato intestinal ( JIN et al.,1998).

**Tabela 4.** Percentual de viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após 4 horas de contato com diferentes concentrações de bile bovina (p/v) em meio SSDL ( % de células viáveis).

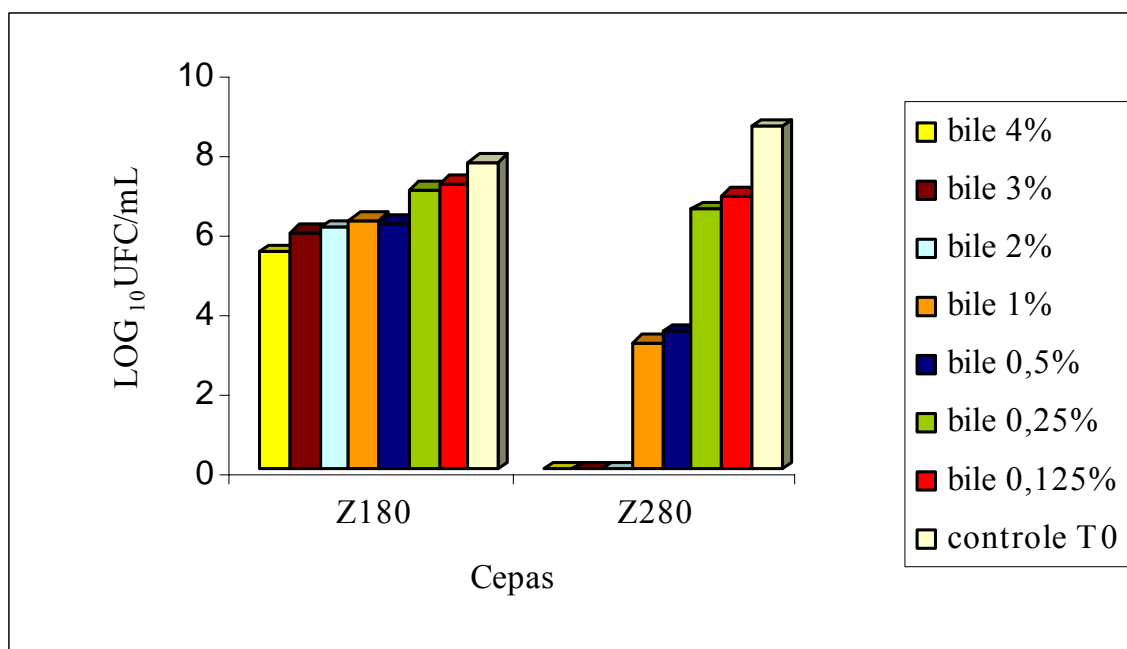
Linhagens	Concentrações de bile						
	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP1	0	0	35,61%	43,56%	45,47%	54,38%	71,78%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP2	0	0	0	0	31,74%	48,51%	49,46%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP3	0	28,53%	34,22%	38,01%	44,59%	49,94%	50,72%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	49,83%	49,94%	50,05%	52,43%	52,75%	89,94%	93,72%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	70,98%	77,20%	78,88%	81,21%	80,31%	91,19%	93,39%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	0	0	0	37,07%	40,09%	75,78%	79,95%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	63,47%	64,24%	68,31%	75,35%	77,22%	80,74%	91,41%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	41,70%	52,87%	52,98%	54,02%	59,88%	75,17%	75,74%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	46,42%	49,33%	49,77%	54,91%	60,93	76,33%	83,14%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	34,49%	42,93%	41,98%	52,21%	58,96%	81,96%	87,86%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	47,37%	48,93%	61,22%	73,63%	71,95%	86,70%	87,70%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 97	37,84%	38,63	39,20%	39,20	46,36	69,88%	72,38%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>3</sub> 97	0	0	0	0	39,71%	70,17%	82,26%

**Tabela 5.** Diminuição da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato durante 4 horas com meio SSDL contendo diferentes concentrações de bile bovina. .  
Expresso em  $\log_{10}$  das unidades formadoras de colônias por mililitro em função do tempo(h).

Linhagens	Concentrações de bile bovina						
	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%
<i>Zymomonas mobilis</i> CP1	0	0	4,7 $\pm$ 0,1	4,12 $\pm$ 0,25	3,98 $\pm$ 0,02	3,33 $\pm$ 0,02	2,06 $\pm$ 0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> CP2	0	0	0	0	5,74 $\pm$ 0,02	4,33 $\pm$ 0,37	4,25 $\pm$ 0,14
<i>Zymomonas mobilis</i> CP3	0	6,41 $\pm$ 0,37	5,9 $\pm$ 0,1	5 $\pm$ 0,1	4,41 $\pm$ 0,1	3,93 $\pm$ 0,33	3,86 $\pm$ 0,12
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	4,64 $\pm$ 0,13	4,63 $\pm$ 0,55	4,62 $\pm$ 0,19	4,4 $\pm$ 0,25	4,37 $\pm$ 0,26	0,93 $\pm$ 0,24	0,58 $\pm$ 0,12
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>180</sub>	2,24 $\pm$ 0,29	1,76 $\pm$ 0,15	1,63 $\pm$ 0,33	1,45 $\pm$ 0,19	1,52 $\pm$ 0,43	0,68 $\pm$ 0,19	0,51 $\pm$ 0,35
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>280</sub>	0	0	0	5,43 $\pm$ 0,27	5,17 $\pm$ 0,36	2,09 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,01
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>181</sub>	3,32 $\pm$ 0,28	3,25 $\pm$ 0,21	2,88 $\pm$ 0,15	2,24 $\pm$ 0,41	2,07 $\pm$ 0,21	1,75 $\pm$ 0,36	0,78 $\pm$ 0,34
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>185</sub>	5,08 $\pm$ 0,45	4,1 $\pm$ 0,1	4,09 $\pm$ 0,12	4 $\pm$ 0,23	3,49 $\pm$ 0,28	2,16 $\pm$ 0,22	2,11 $\pm$ 0,08
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>186</sub>	4,8 $\pm$ 0,09	4,54 $\pm$ 0,14	4,5 $\pm$ 0,14	4,04 $\pm$ 0,27	3,5 $\pm$ 0,43	2,12 $\pm$ 0,30	1,51 $\pm$ 0,4
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>188</sub>	6,21 $\pm$ 0,38	5,41 $\pm$ 0,007	5,5 $\pm$ 0,37	4,53 $\pm$ 0,45	3,89 $\pm$ 0,07	1,71 $\pm$ 0,43	1,15 $\pm$ 0,19
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>194</sub>	4,71 $\pm$ 0,21	4,57 $\pm$ 0,30	3,47 $\pm$ 0,16	2,36 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 0,38	1,19 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,15
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>297</sub>	5,47 $\pm$ 0,04	5,4 $\pm$ 0,42	5,35 $\pm$ 0,21	5,35 $\pm$ 0,21	4,72 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,02	2,43 $\pm$ 0,19
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>397</sub>	0	0	0	0	3,84 $\pm$ 0,33	2,06 $\pm$ 0,1	1,13 $\pm$ 0,24

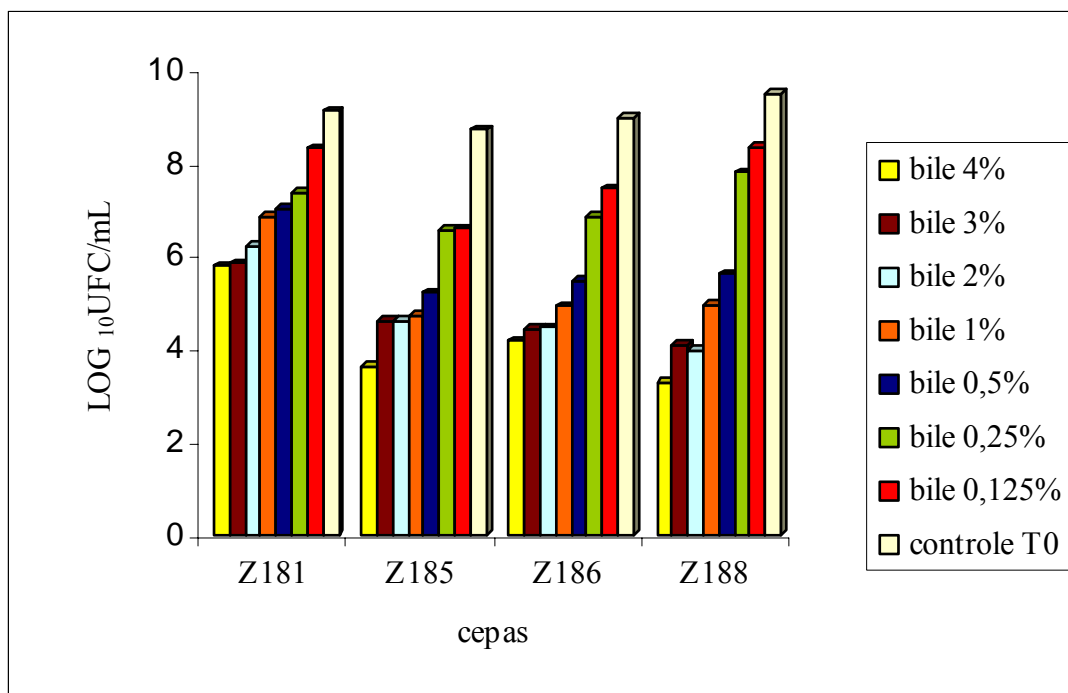


**Figura 7.** Tolerância à bile bovina de *Zymomonas mobilis*. Cepas CP1, CP2, CP3 e CP4.

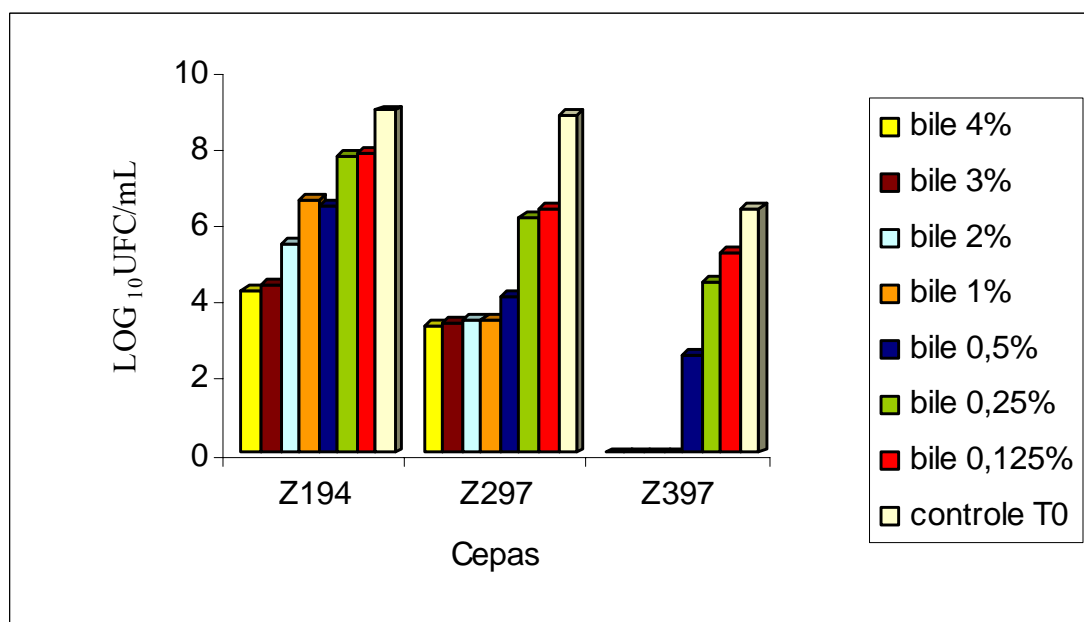


**Figura 8.** Tolerância à bile bovina de *Zymomonas mobilis*. Cepas Z<sub>180</sub> e Z<sub>280</sub>.





**Figura 9.** Tolerância . à bile bovina de *Zymomonas mobilis*. Cepas Z<sub>181</sub>, Z<sub>185</sub>, Z<sub>186</sub> e Z<sub>188</sub>.



**Figura 10.** Tolerância . à bile bovina de *Zymomonas mobilis*. Cepas Z<sub>194</sub>, Z<sub>297</sub> e Z<sub>397</sub>.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS CULTURAS DE *Zymomonas mobilis* AO ÁCIDO CLORÍDRICO E À BILE BOVINA ASSOCIADOS

Baseado nos resultados anteriormente citados referentes à tolerância ao ácido clorídrico e a bile bovina foram selecionadas cinco cepas de *Zymomonas mobilis*, as mais resistentes (CP4, Z<sub>194</sub>, Z<sub>180</sub>, Z<sub>181</sub>, Z<sub>185</sub>, Z<sub>186</sub>, Z<sub>188</sub> e Z<sub>280</sub>), para avaliação do crescimento em meio de SSDL acidificado pH 2,5; 3,0 e 4,0, contendo uma concentração final de 0,3 % p/v de bile bovina.

As tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e as figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, mostram os resultados obtidos para a viabilidade celular das cepas CP4, Z<sub>194</sub>, Z<sub>180</sub>, Z<sub>181</sub>, Z<sub>185</sub>, Z<sub>186</sub>, Z<sub>188</sub> e Z<sub>280</sub>, expresso pela quantificação das unidades formadoras de colônias/mL ao longo de 4 horas de incubação.

As cepas Z<sub>181</sub> e Z<sub>185</sub> foram sensíveis às associações meio SSDL pH 2,5 + 0,3 % p/v de bile e meio SSDL pH 3,0 + 0,3 % p/v de bile (Tabelas 6 e 7, Figuras 13 e 14).

Todas as cepas de *Zymomonas mobilis* sobreviveram à associação do meio SSDL pH 4,0 com 0,3 % p/v de bile bovina. Nestas condições, a cepa Z<sub>194</sub> apresentou o maior percentual de sobrevivência e diminuição do inóculo inicial de 1,14 log<sub>10</sub>UFC/mL  $\pm$  0,1. *Zymomonas mobilis* Z<sub>185</sub> mostrou-se a mais sensível a esta associação, cujo percentual de sobrevivência e diminuição do inóculo foram de 70,02 % e 2,74 log<sub>10</sub>UFC/mL  $\pm$  0,17, respectivamente (Tabelas 10 e 11; Figuras 15 e 14).

Muitos autores têm comprovado que as variações existentes na habilidade de lactobacilos de crescerem em presença de ácido clorídrico e sais biliares, estão provavelmente relacionadas à propriedades intrínsecas das bactérias ( BERRADA et al., 1991; PORCHART et al., 1992; IBRAHIM & BEZKOROVAINY, 1993; CLARK & MARTIN, 1994; LIAN et al., 2003; HYRONINUS et al., 2000).

Para a associação do meio SSDL pH 2,5 com 0,3 % p/v de bile bovina, *Zymomonas mobilis* Z<sub>180</sub> foi sensível, mas tolerante a SSDL pH 3,0 com 0,3 % p/v de bile bovina, dentre as cepas estudadas. Na primeira hora de contato com esta associação um percentual de sobrevivência desta cepa equivalente a 64,41 % foi observado. Após quatro horas de contato não houve mudança significativa ( $p \leq 0,05$ ) deste percentual (Tabelas 6 e 7; Figura 12).

A cepa Z<sub>194</sub> após contato por 3 horas com meio SSDL pH 2,5 com 0,3 % p/v de bile bovina, apresentou um decréscimo do inóculo inicial de  $6,04 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,15$ , correspondendo à 34,63 % de viabilidade celular. Esta cepa foi tolerante às associações SSDL pH 3,0 ou 4,0 com 0,3 % p/v de bile bovina cujas reduções do inóculo inicial na primeira hora de contato foi de  $4,01 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,36$  e de  $2,74 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,13$  respectivamente (Tabelas 6, 7, 8, 9, 10, e 11; Figura 15).

Após 2 horas de contato com o meio SSDL pH 4,0 com 0,3 % p/v de bile bovina, *Zymomonas mobilis* Z<sub>194</sub> mostrou uma adaptação ao meio visualizada através de um recrescimento que atingiu valores de  $1,14 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  após 4 horas de contato. Este mesmo perfil foi observado com a associação SSDL pH 3,0 contendo 0,3% p/v de bile bovina cujo recrescimento foi visualizado após 2 horas de contato, da ordem de  $3,68 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,23$  (Tabela 8, 9, 10 e 11; Figura 15).

A cepa Z<sub>186</sub> apresentou na primeira hora de contato com o meio SSDL pH 2,5 com 0,3% p/v de bile bovina uma diminuição do inóculo inicial de  $7,1 \pm 0,1 \log_{10}\text{UFC/mL}$ , que corresponde a um percentual de 24,78% de viabilidade celular. Após 2 horas de contato não houve aparecimento de células viáveis o que se manteve após 3 e 4 horas (tabelas 6 e 7; Figura 17).

*Zymomonas mobilis* Z<sub>188</sub> após contato com o meio SSDL pH 2,5 com 0,3% p/v de bile bovina apresentou na primeira hora uma diminuição do inoculo inicial de  $6,15 \pm 0,1 \log_{10}\text{UFC/mL}$  e 35,26% de viabilidade celular que se manteve após 4 horas. Esta cepa foi tolerante às associações SSDL pH 3,0 ou 4,0 com 0,3 % p/v de bile bovina cujas reduções do inóculo inicial na primeira hora de contato foi de  $4,11 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  e de  $3,27 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  respectivamente (Tabelas 9 e 11; Figura 15).

Para a associação do meio SSDL pH 2,5 com 0,3 % p/v de bile bovina, *Zymomonas mobilis* Z<sub>280</sub> foi sensível, mas tolerante. Na primeira hora de contato com esta associação um percentual de sobrevivência desta cepa equivalente a 48,51 % foi observado. Após quatro horas de contato não houve mudança significativa ( $p \leq 0,05$ ) deste percentual (Tabelas 6 e 7; Figura 18). Esta cepa foi tolerante às associações SSDL pH 3,0 ou 4,0 com 0,3 % p/v de bile bovina cujas reduções do inóculo inicial na primeira hora de contato foi de  $4,85 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  e de  $2,98 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  respectivamente (Tabelas 6, 7, 8, 9, 10, e 11; Figura 18).

Estudos correlacionam a tolerância de *Zymomonas mobilis* à altos níveis de etanol durante o processo fermentativo, à presença de hopanóides e do ácido cis-

vacênico na membrana celular, os quais protegem a bactéria dos efeitos tóxicos do etanol e da presença de ácidos orgânicos (BRINGER et al., 1985; HERMANS et al., 1991; SCHIMIDT et al., 1986, MOREAU et al., 1997). Este ou um mecanismo análogo pode estar relacionado com a tolerância de *Zymomonas mobilis* ao ácido clorídrico encontrada no presente estudo.

Todas as cepas de *Zymomonas mobilis* estudadas foram isoladas de fermentação alcoólica. Possivelmente estas cepas foram pré selecionadas durante a fermentação, justificando assim, o crescimento em pH ácido.

*Zymomonas mobilis* CP4 após contato por uma hora com meio SSDL pH 2,5 + 0,3 % p/v de bile bovina apresentou um decréscimo do inóculo inicial de  $6,0 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$ , correspondendo a 36,64 % de viabilidade celular. A partir de 3 horas de contato com esta associação, a cepa CP4 mostrou um percentual de sobrevivência equivalente a 33,26 % com redução do inóculo inicial de  $6,32 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,21$  o qual foi mantido, demonstrando assim que a cepa estava se adaptando às condições do meio ( Tabelas 6 e 7; Figura 11). Para as associações pH 3,0 e pH 4,0 + 0,3 0 % p/v de bile bovina após uma hora de contato, houve um decréscimo do inóculo inicial de  $4,47 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  e  $2,99 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,19$  respectivamente. Após 4 horas de contato, visualizamos um recrescimento com valores de  $2,69 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,1$  e  $2,73 \log_{10}\text{UFC/mL} \pm 0,01$ , respectivamente(Tabelas 8, 9, 10 e 11; Figura 11).

No trabalho desenvolvido por Yablonsky et al. (1988) foi analisado o perfil plasmídico das linhagens de *Zymomonas mobilis* do grupo CP, e concluído que CP1, CP2 e CP3 são idênticas a CP4. Entretanto esta semelhança não influenciou a tolerância destas linhagens ao ácido clorídrico e à bile bovina, uma vez que, resultados distintos foram obtidos.

Hipóteses acerca destas variações em linhagens de *Zymomonas mobilis* foram publicadas por Skotonick et al., (1981), Warr et al., (1984) e Yablonsk et al. (1988), e justificadas por modificações do conteúdo genômico plasmidial por deleção, rearranjo ou mutagênese.

As cepas CP4 e Z<sub>1</sub>94 apresentaram um recrescimento provavelmente relacionado ao surgimento de uma nova população, cujas variantes foram selecionadas durante a exposição ao ácido clorídrico e à bile bovina.

Estes resultados corroboram aos de Chou, & Weimer (1999), que observaram uma grande variabilidade na sobrevivência de linhagens mutantes de lactobacilos tolerantes ao ácido e à bile quando relacionadas às linhagens parentais.

Processos tecnológicos, como a microencapsulação visam proteger a célula microbiana contra ambientes hostis e são experiências de sucesso (KHALIL & MANSUR, 1998; LEE & HEO, 2000).

Lian *et al.*, (2003), microencapsulou células de *Bifidobacterium* obtendo resultados positivos quando comparado às células não encapsuladas postas em meio contendo suco gástrico pH 2,0 ou em meio contendo 2,0 % p/v de bile bovina.

O processo da microencapsulação melhora a sobrevivência do microorganismo durante a passagem através do estômago facilitando assim, a sua colonização no intestino, e seria uma alternativa para os microorganismos pouco tolerantes às condições estudadas.

**Tabela 6.** Percentual de viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 2,5 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

Linhagens	Tempo de exposição (h)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	36,64%	35,37%	33,26%	33,26%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	29,11%	23,80%	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	24,78%	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	35,26%	34%	34,73%	31,57%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	31,42%	27,17%	25,26%	24,20%

**Tabela 7.** Diminuição da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 2,5 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

Linhagens	Tempo de exposição (h)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	6,0±0,1	6,12±0,38	6,32±0,21	6,32±0,21
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	5,55±0,1	6,04±0,15	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	7,1±0,1	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	6,15±0,1	6,27±0,1	6,2±0,1	6,5±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	6,46±0,1	6,86±0,1	7,04±0,1	7,14±0,1

Os valores estão representados pela diminuição do inóculo bacteriano expresso em log<sub>10</sub> em função do tempo expresso em horas.

**Tabela 8.** Percentual da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 3,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

Linhagens	Tempo de exposição (horas)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	52,79%	60,50%	64,94%	71,59%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	56,60%	60,17%	64,93%	63,85%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	64,41%	63,20%	60,31%	62,12%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	46,50%	45,55%	46,39%	46,61%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	56,73%	55,78%	56,10%	55,26%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	48,51%	47,66%	46,49%	42,46%

**Tabela 9.** Diminuição da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 3,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

Linhagens	Tempo de exposição (h)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	4,47±0,1	3,74±0,05	3,32±0,21	2,69±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	4,01±0,36	3,68±0,23	3,24±0,1	3,34±0,03
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	2,95±0,48	3,05±0,34	3,29±0,1	3,14±0,21
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	5,05±0,1	5,14±0,1	5,06±0,1	5,04±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	4,11±0,1	4,20±0,1	4,17±0,1	4,25±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	4,85±0,1	4,93±0,1	5,04±0,1	5,42±0,1

Os valores estão representados pela diminuição do inóculo bacteriano expresso em log<sub>10</sub> em função do tempo expresso em horas.

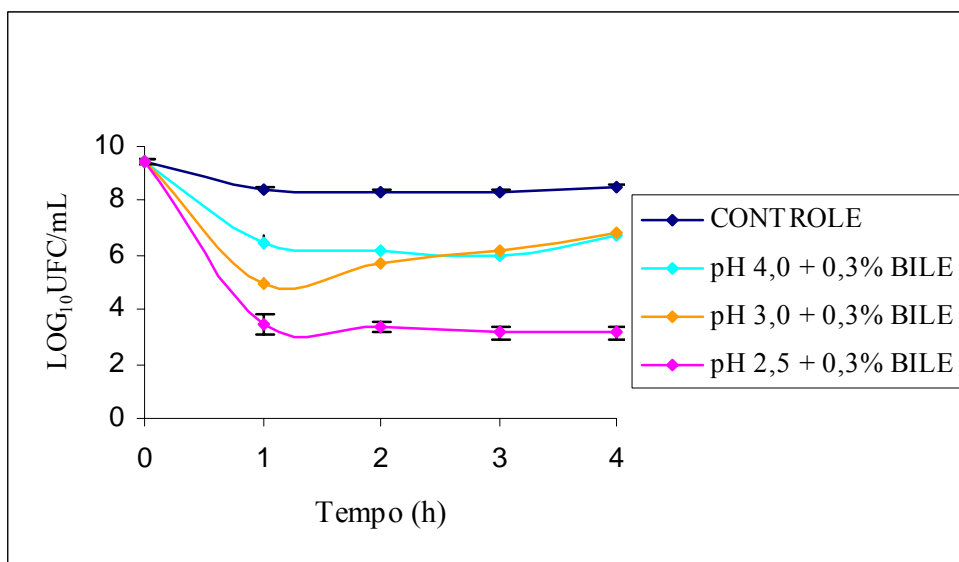
**Tabela 10.** Percentual de viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 4,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

Linhagens	Tempo de exposição (h)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	68,42%	64,94%	63,35%	71,17%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	70,34%	64,93%	86,58%	87,66%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	68,51%	74,06%	72,37%	75,15%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	67,28%	67,83%	69,47%	70,02%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	62,13%	70,33%	70,33%	70,33%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	72,45%	69,80%	70,02%	70,97%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	65,57%	64,73%	63,15%	63,15%
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	68,36%	67,30%	64,33%	66,34%

**Tabela 11.** Diminuição da viabilidade celular de *Zymomonas mobilis* após contato com Meio SSDL pH 4,0 contendo 0,3 % p/v de bile bovina.

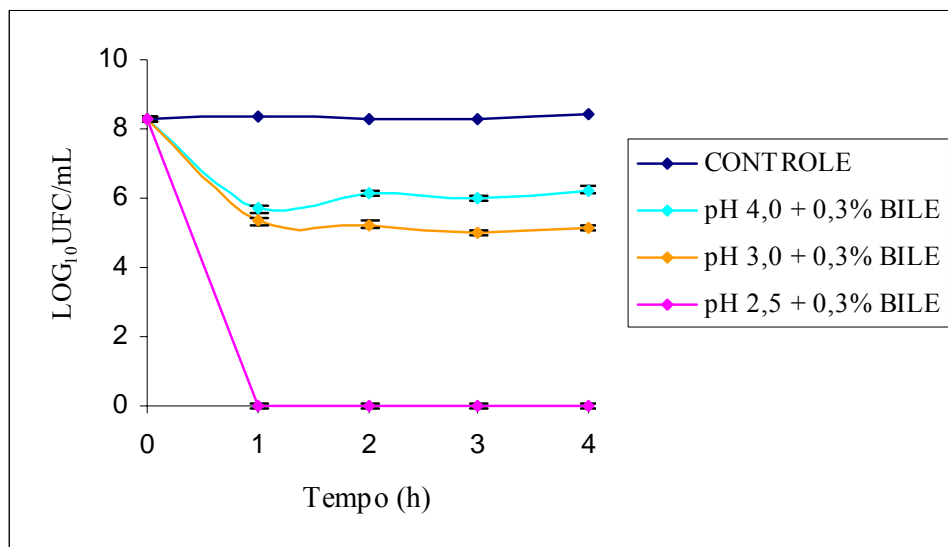
Linhagens	Tempo de exposição (h)			
	1	2	3	4
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	2,99±0,19	3,32±0,21	3,47±0,1	2,73±0,01
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 94	2,74±0,13	3,24±0,1	1,24±0,1	1,14±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 80	2,61±0,30	2,15±0,1	2,29±0,1	2,06±0,33
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 81	2,99±0,21	2,94±0,17	2,79±0,09	2,74±0,17
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 85	3,23±0,1	2,53±0,1	2,53±0,1	2,53±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 86	2,6±0,1	2,85±0,1	2,83±0,1	2,74±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>1</sub> 88	3,27±0,1	3,35±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1
<i>Zymomonas mobilis</i> Z <sub>2</sub> 80	2,98±0,1	3,08±0,1	3,36±0,1	3,17±0,1

Os valores estão representados pela diminuição do inóculo bacteriano expresso em log<sub>10</sub> em função do tempo expresso em horas.

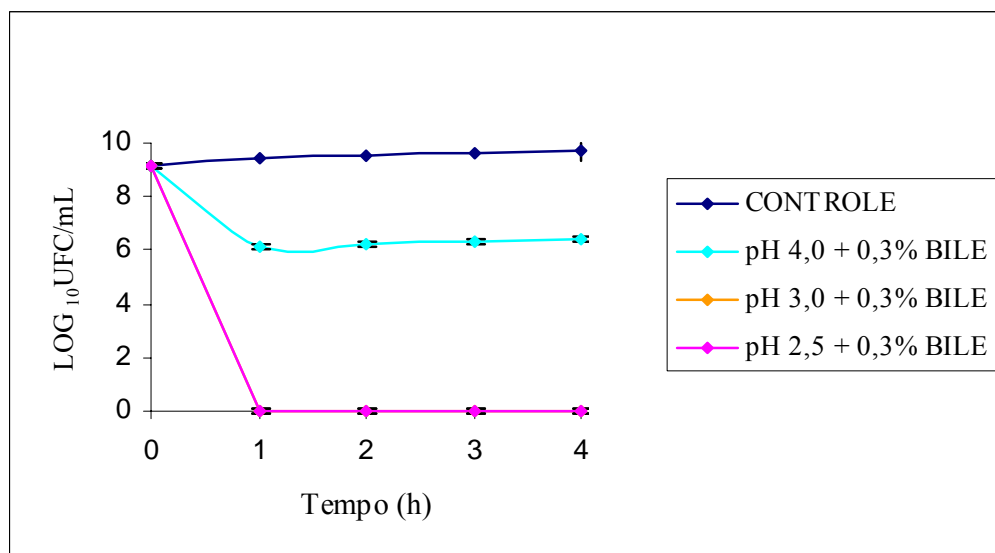


**Figura 11.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* CP4 em diferentes valores de pH com bile bovina.

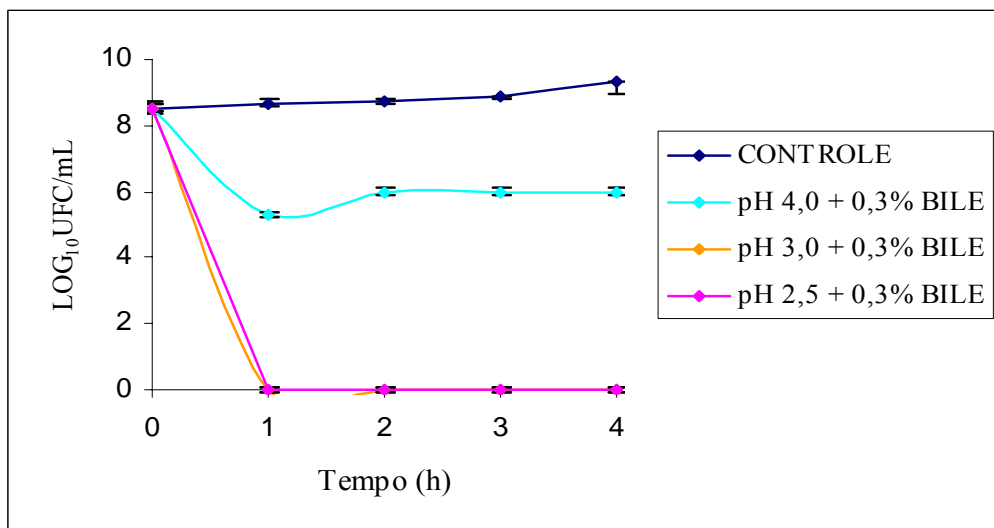




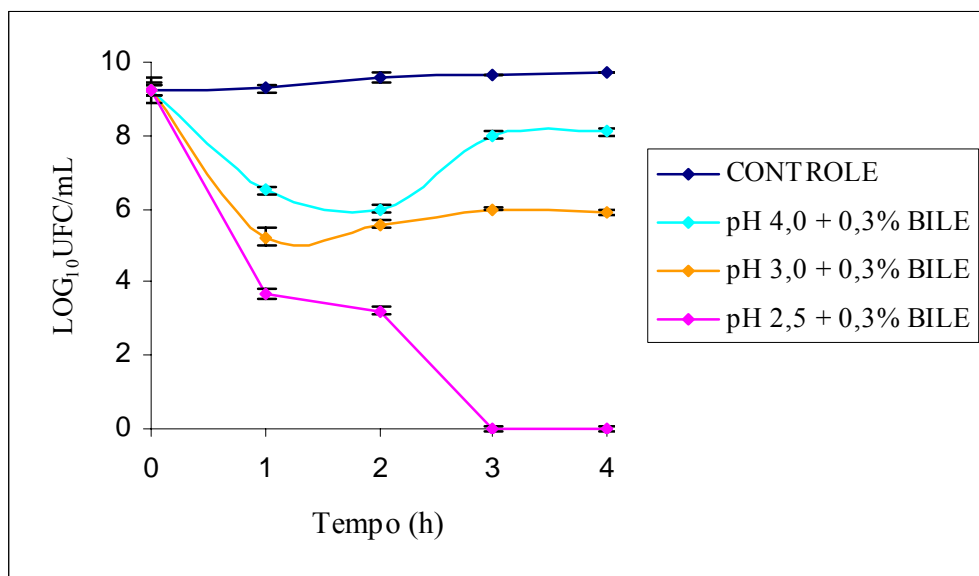
**Figura 12.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z<sub>180</sub>.



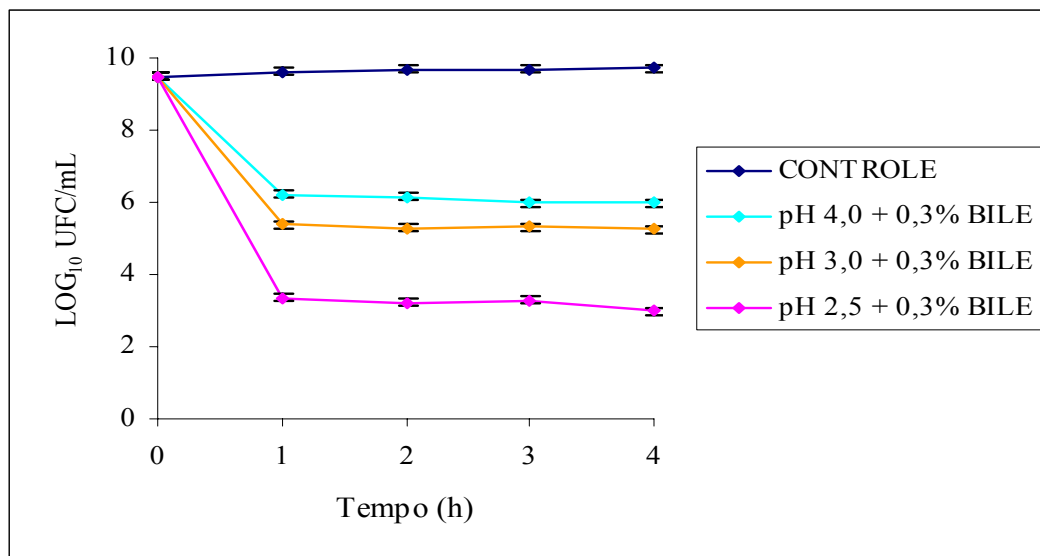
**Figura 13.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z<sub>181</sub>.



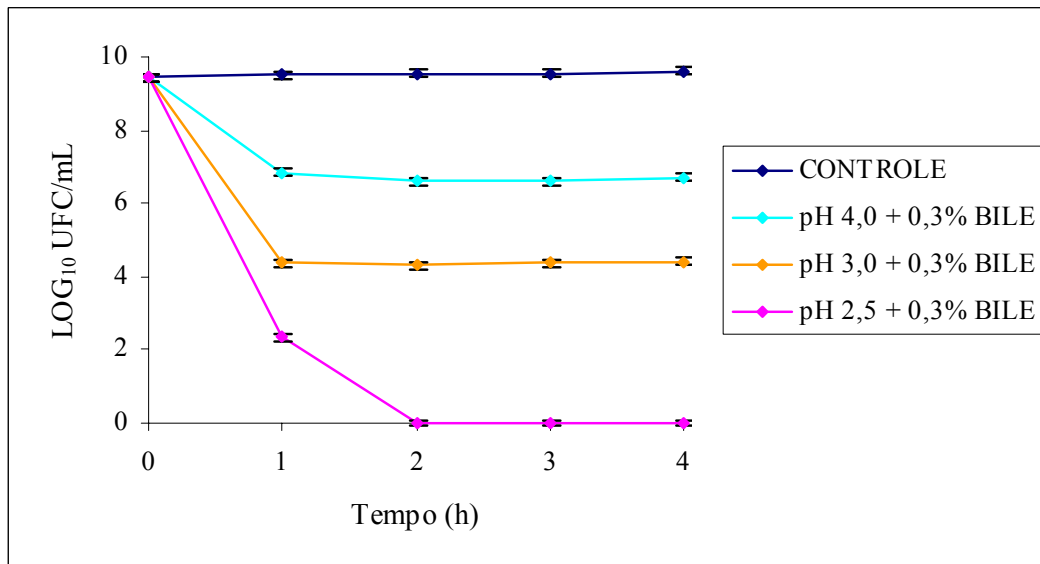
**Figura 14.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z<sub>185</sub>.



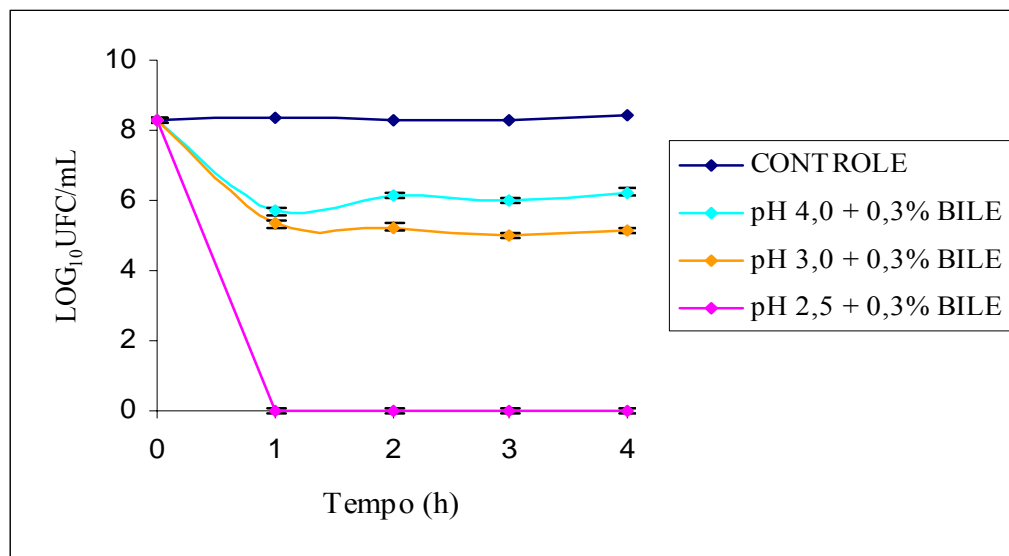
**Figura 15.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cepa Z<sub>194</sub>.



**Figura 16.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cpa Z188.



**Figura 17.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cpa Z186.



**Figura 18.** Avaliação da tolerância de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH com bile bovina Cepas Z<sub>280</sub>.

## ***6. CONCLUSÕES***

---

## 6. CONCLUSÕES

---

Após este estudo podemos concluir que:

- Cepas de *Zymomonas mobilis* tolerantes ao ácido clorídrico e a bile bovina foram selecionadas;
- Destas cepas, 100% foram tolerantes a  $\text{pH} \geq 3,0$ ;
- *Zymomonas mobilis* Z<sub>194</sub> mostrou ser a mais tolerante sobrevivendo em meio SSDL pH 2,5.
- Cerca de 84,61% sobreviveram em concentrações biliares iguais ou inferiores a 1%;
- Quando associado, o meio SSDL acidificado com bile bovina, todas as cepas de *Zymomonas mobilis* tiveram a viabilidade diminuídas, exceto quando o pH foi  $\geq 3,0$ .
- As cepas CP4, Z<sub>194</sub>, Z<sub>188</sub> e Z<sub>280</sub> se mostraram as mais tolerantes as associações de SSDL pH 2,5; 3,0 e 4,0 com 0,3% p/v de bile bovina.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

BACELAR, T. S. **A ação da *Zymomonas mobilis* na peritonite experimental: Influência no desenvolvimento de peritonite, mortalidade e formação de abscesso.** 1997. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic bacteria. **Gut**, v. 42, p. 2-7, 1998.

BERRADA, N.; LEMELAND, J.F.; LAROCHE, G.; THOUVENOT, P.; PIAIA, M. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 409-413, 1991.

BEZKOROVAINY, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 2, p. 399-405, 2001.

BERZIRTZOGLU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173-177, 1997.

BRASSART, D.; SCHIFFRIN, E. J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends in Food Sci. & Technol.**, v. 8, p. 321-6, 1997.

BRINGER, S.; HARTNER, T.; PORALLA, K.; SAHM, H. Influence of ethanol on the hopanoid content and fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. **Arch. Microbiol.**, v. 40, p. 312-316, 1985.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F.P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **Int. J. of Biol. Macrom.**, v. 27, p. 245-247, 2000.

CANGANILLA, F.; PAGANINI, S.; OVIDI, M.; VETTRAINO, A. M.; BEVILACQUA, L.; MASSA, S.; TROVATELLI, L. D. A microbiology investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. **Microbiol. Res.**, v.152, n.2, p.171-179, 1997.



CARULLI N.; LORIA P.; BERTOLOTTI M.; CARUBBI F.; TRIPODI A.; ABATE N.; DILENGITE M. Effects of bile acid pool composition on hepatic metabolism of cholesterol in man. **Ital. J. Gastroenterol.** v.22, n.2, p. 88-96. 1990.

CARULLI N.; BERTOLOTTI M.; CARUBBI F.; CONCARI M.; MARTELLA P.; CARULLI L.; LORIA P. Effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.14, Supl. 2, p.8-14, 2000.

CARVALHO , F. **Avaliação da ácido tolerância de linhagens de *Zymomonas mobilis*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 2003, Recife.

CHOU, L.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 23-31, 1999.

CLARK, P. A.; MARTIN, J. H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. **Cult. Dairy Prod. J.** v. 29, n. 3, p. 18-21, 1994.

CLAVIGERO, F.S. "The History of Mexico". Book VII, Sec. Ed. London, 435 (1807). In: GONÇALVES DE LIMA, O.; ARAÚJO, J. M.; SHUMACHER, I. E.; CAVALCANTI DA SILVA, E. Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (LINDNER) (1928) Kluyver e Vanniel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* isolada da bebida popular denominada "caldo-de-cana picado". **Rev. Inst. Antib.**, v. 11, n. 1 e 2, p. 3-15, 1970.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69(supl), p.1052s-7s, 1999.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 487-490, 1998.

CONWAY, P. L.; GORBACH, S.L.; golden, B. R. Survival of lactic acid bacteria in human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v.70, p. 1-12. 1987.

DADDS, M. J. S.; MARTIN, P. A. The Genus *Zymomonas* - A review. **J. of the Inst. of Brewing**, v. 79, n. 5, p. 386-391, 1973.

DALY, C.; DAVIS, R. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. **Agric. Food Sci. Finland.**, v. 7, p. 251-265, 1998.

DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W.; REES, D. A. Sucroses utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. **The Bioch. J.**, v.98, n 1, p. 804-812, 1966.

DE SMET, I.; VAN HOORDE, N.; DE SAEYER, M.; WOESTYNE, M.V.; VERSTRAETE, W. In vitro study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. **Microbiol. Ecol. Health Dis.**, v.7, p. 315-329, 1994.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. 26. ed São Paulo: Produção: **Jornal Brasileiro de Medicina**, 2000/2001.

DUNNE , C.; MURPHY, L.; MORRISSEY, D. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo finding. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 386-392, 2001.

DUWAT, P.; CESSSELIN, B.; SOURICE, S.; GRUSS, A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. **Int. J. Food Microbiol.** v.55, p. 83-86, 2000.

EHRMANN, M. A.; KURZAK, P.; BAUER, J.; VOGEL, R. F. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 966-975, 2002.

ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M.; McFARLAND, L. V. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **JAMA**, v. 275, n. 11, p. 870-876, 1996.

ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, J. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 251-256, 1989.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. **Rev. Inst. Antib.**, v. 21, n.1 e 2, p.169-182, 1982/1983.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; ARAÚJO, J. M.; RIOS, E. M.; MELLO, B. R. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. **Rev. Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 6-10, 1983.

FALK, P.; HOOPER, L.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem. **Microbiol. Molecular Biol. Rev.**, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FONS, M.; GOMEZ, A.; KARJALAINEN, T. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. **Microbial. Ecol. Health Dis.**, v. 2 (suppl), p. 240-246, 2000.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Probiotics as modulators of the gut flora. **Br. J. Nutr.**, v. 88, n. 1, p. 39-49, 2002.

FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Vet. Med.**, v. 83, n. 8, p. 806-829, 1988.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bact.**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, p. 439-442, 1991.

FULLER, R.; GIBSON, G. R. Modification of the intestinal microflora using probióticos and prebiotics. **Scandinavian J. of Gastroent.**, v.32, n. 222, p. 28-31, 1997.

GIBBS, M.; DE MOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C 14 - labeled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. **J. Biol. Chem.**, v. 20, n. 7, p. 689-694, 1954.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S. E. Importance of bile tolerance in lactobacilli used as dietary adjunct. In **Biotech. in the Feed Indust.** ed. Lyons, T. P. Kentucky, USA: Allech Feed Co. p. 149-155, 1987.

GILLILAND, S. E.; KIM, H. S. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. **J. Dairy Sci.**, v.67, p. 1-6, 1984.

GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 377-381, 1985.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **J. Dairy Sci.**, v.67, p. 3045-3051, 1984.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **B. de Biotecnol.**, p. 12-22, 2000.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS,V.. A review on the use of microorganism as probiotics. **Rev. Latino-americana de Microbiol.**, v. 40, p. 166-172, 1998.

GONÇALVES DE LIMA, O.; ARAÚJO, J. M.; SHUMACHER, I. E.; CAVALCANTI DA SILVA, E. Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (LINDNER) (1928) Kluyver e Vanniel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* isolada da bebida popular denominada “caldo-de-cana picado”. **Rev. Inst. Antib.**, v. 11, n. 1 e 2, p. 3-15, 1970.

GONÇALVES DE LIMA, O.; SCHUMACHER, I. E.; ARAÚJO, I. M. New observation about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev. Inst. Antib.**, v. 12, n. 1 e 2, p. 57-69, 1972.

GONÇALVES DE LIMA, O. **Pulque, Balche e Pajauaru na etiologia das bebidas e dos alimentos fermentados**. Recife. Universidade Federal de Pernambuco. p. 405, 1975.

GUARNER ,F.; CASELLAS, F.; BORRUEL, N.; ANTOLIN, M.; VIDELA, S.; VILASECA, J.; MALAGELADA, J.R. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, n. 4, p. 34-38, 2002.

GUARNER, F., MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **Lancet.**, v. 8, n. 361, p. 512-519, 2003

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 237-238, 1998.

HAWES, S. E.; HILLIER, S.L.; BENEDETTI, J.; STEVENS, C.E.; KOUTSKY, L.A.; HANSEN, P.W.; HOLMES, IK.K. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and aquisition of vaginal infections. **J. Infect. Dis.**, v.174, p. 1058-1063, 1996.

HELANDER, H. F.; KEELING D. J. Cell biology of gastric acid secretion, **Baillieres Clin. Gastroenterol.**, v.7, n.1, p-1-21, 1993.

HENRIKSSON, A.; KHALED, A. K. D.; CONWAY, P. L. Lactobacillus colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecretig stomach region. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 11, p. 96-99, 1999.

HERMANS, M. A. F.; NEUSS, B.; SAHM, H. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various groth conditions. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 5592-5595, 1991.

HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, S.J.; ESCHENBACH, D.A. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. **Obstet. Gynecol.**, v. 79, p. 369-373, 1992.

HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; ESCHENBACH, D.A.; KROHN, M. A.; GIBBS, R.S.; MARTIN, D.H.; COTCH, M. F.; EDELMAN, R.; RASTOREK, J. G.; RAO, A.V.; et al. Association between bacterial vaginosis and pretern delivery of alow-birth-weighth infant. The vaginal infections and prematurity study group. **N. Engl. J. Med.**, v. 333,n. 26, p. 1737-1742, 1995.

HOLCOMB, J. E.; FRANK, J. F.; MCGREGOR, J. U. Viability of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in solt serve frozen yogurt. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 26, p. 4-5, 1991.

HOLT, J. O.; KRIEG, N. R.; SNEATH, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed Baltimore: Willians & Wilkins, p. 201, 1994.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS in't VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Intern. J. of Food Microbiol.**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOSE, H.; SOZZI, T. Probiotics, fact or fiction. **J. Chem. Techonol. Biot.**, v. 51 p. 540-541, 1991.

HYRONIMUS, B.; MARREC C. L.; SASSI, A.H.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **Intern. J. of Food Microbiol.** v. 61, p. 193, 2000.

IBRAHIM, S. A.; BEZKOROVAINY, A. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. **J. Sci. Food Agric.** v. 62, p. 351-154, 1993.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 465-470, 2001.

ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 444-450, 2001.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PAERREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M. and JAKOBSEN, M. Screening of probiotics activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4949-4956, 1999.

JALES, S. T. L.; ALMEIDA, R. C.; CALAZANS, G. T.; RIOS, E. M.; XIMENES, E. C. P. A. Efeito bactericida e fungicida de *Zymomonas mobilis*. In: **XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Rio de Janeiro, RJ, 1999.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21ª ed Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 144, 191, 194, 2000.

JERNIGAN, M. A.; MILES, R. D. and ARAFA, A. S. Probiotics in poultry nutrition, a review. **World's Poultry Sci. J.**, v. 41, p. 99-107, 1985.

JIN, L. Z.; IHO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.**, v. 53, p. 351-368, 1997.

JIN, L. Z.; IHO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 183-185, 1998.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 15, n.1, p.1-9, 2002.

KHALIL, A. H.; MANSOUR, E. H. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. **J. Food Sci.**, v. 63, p. 702-705, 1998.

KIRJAVAINEN, P. V.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. J. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 167, p. 185-189, 1998.

KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylatic and therapeutic use of probiotics: a review. **J. of the Am. Dietetic Assoc.**, v. 101, p. 229-238, 2001.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. **Cult. Dairy Prod. J.** v.30, p. 2-7, 1995.

LANZINI, A., LANZAROTTO, F. Review article: the 'mechanical pumps' and the enterohepatic circulation of bile acids--defects in coeliac disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, n. 14, n. 2, p. 58-61, 2000.

LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 869-873, 2000.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Foods Sci. Technol.**, v. 6, p. 241-245, 1995.

LEWIN, M.J. Cellular mechanisms and inhibitors of gastric acid secretion. **Drugs Today**. v.35, n. 10, p. 743-752. 1999.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **Intern. J. of Food Microbiol.**, v. 86, p.293-301, 2003.

LOPES, C. A. C.; GONÇALVES DE LIMA, O.; SILVA-FILHO, A. A.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SILVA, E. C.; MELO, B. R. Efeitos obtidos com o emprego de culturas de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em pacientes portadores de enterocolites bacterianas. **Rev. Inst. Antib.** v.20, n.1/2, p. 69-78, 1980

MAGALHÃES NETO, B.; GONÇALVES DE LIMA, O.; MARINHO DE ALMEIDA, A.; FALCÃO DE MORAIS, J. O. A utilização de carboidratos e outras substâncias nutritivas por *Zymomonas mobilis* (= *Pseudomonas lindneri*), cepa Ag11 isolada em 1951. **Anais da Esc. Super. de Quím.**, v. 1, n.1, p. 83-88, 1959.

MANN, G. V. A. Factor in yoghurt wich lowers cholesteremia in man. **Atheroscler.**, v.26, p. 335-340, 1977.

MARIN, M. L.; LEE, J. H.; MURTHA, J.; USTNOL, Z.; PESTK, J.J. Diferential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with *Bifidobacterium*. **J. of Dairy Sci.**, v. 80, p. 2713-2720, 1997.

MARSHALL, V. M. Gut-derived organisms for milk fermentations. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 51, p. 548-553, 1991.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; RAMBAUD, J. C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic micro-organisms in the human intestine. *In*: SIMOPOULOS, A. P.; CORRING, T.; RÉRAT, A. eds. Intestinal flora, immunity, nutrition and health. **World Ver. Nutr. Diet.**, v. 74, p. 1-21, 1993.

MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J.; LIO, J. The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 667-680, 1999.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. **Altech Biotech. in the Feed Ind.**, p. 133-50, 1993.

MITSUOKA, T. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. **Biosc. Microflora**, v. 19, n. 1, p. 15-25, 2000.

MONOGRAFIA DANONE. Mechanisisms of protection of the digestive tract. *In*: **Nutrition Anal Health collection**, edition John Libbey, p. 1-47, 1998.

MONOGRAFIA DANONE VITAPOLE. Special Issue: Effect of probiotics on body's natural defenses. **X International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology**. Paris, July, 2002.

MOREAU, R. A.; POWELL, M. J.; FETT, W. F.; WHITAKER, B. D. The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. **Curr. Microbiol.**, v. 35, p. 124-128, 1997.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, v. 39, n. 1, p. 1-126, 1999.



O'SULLIVAN, G.C. Probiotics. **Brit. J. of Surg.**, v. 88, p. 161-162, 2001

PAULA GOMES, A. Observações sobre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver; Van Niel, 1936. ( *Termobacterium mobile*, Lindner, 1928; *Pseudomonas lindneri*, Kluyver; Hoppenbrouwers, 1931), na terapêutica humana. **Rev. Inst. Antib.** v.2, n.1/2, p. 77-81, 1959.

PETTOELLO, M. M.; GUANDALINI, S.; ECUBA, P.; CORVINO, C.; di MARTINO, L. Lactose malabsorption in children with symptomatic *Giardia lamblia* infection: feasibility of yoghurt supplementation. **J. Pediatr. Gastroen. Nutr.**, v.9, p. 295-300, 1989.

PORCHART, P.; MARTEAU, P.; GODEREL, B.Y.; BORLIOUX, P. I.; RAMBAUD, J. C. Survival of bifidobacteria ingest via fermented milk during their passage the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, p. 78-80, 1992.

PRINZ C.; KAJIMURA M.; SCOTT D.; HELANDER H.; SHIN J.; BESANCON M.; BAMBERG K.; HERSEY S.; SACHS G. Acid secretion and the H,K ATPase of stomach.. **Yale J. Biol. Med.** v.65, n. 6, p. 577-596. 1992.

RENNER, E. Cultured dairy products in human nutrition. **Bull. Int. Dairy Fed.**, v. 255, p. 2-24, 1991.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J. And MATTILA-SANDHOLM, J. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, a review. **J. Biotech.**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; OSNELA, T. Gut flora in normal and diseased states. **Chemoth.**, v. 41 (suppl), p. 5-15, 1995.

SANDERS, M. E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 384S-390S, 2000.

SANTOS, J. F.M.; VASCONCELOS, J.F.N.; MONTENEGRO, S.M.L.; AZEVEDO-XIMENES, E. Effects of *Z. mobilis* in experimental *Schistosoma mansoni* infection in **8<sup>th</sup> International Symposium on Schistosomiasis**, 2001, Recife- PE, p. 153.

SHANE, G. S. et al. Isolation and preliminary characterization of a *Zymomonas mobilis* mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 157-164, 2000.

SCHMIDT, A.; BRINGER-MEYER, S.; PORALLA, K.; SAHM, H. Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 32-36, 1986.

SCHNEEMAN, B.O. Gastrointestinal physiology and functions. **Br. J. Nutr.**, v. 88, n. 2, p. 159-163, 2002.

SKOTNICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, p. 889-893, 1981.

SMORAGIEWICZ, W.; BIELECKA, M.; BUCHOWSKI, A.; BOUTARD, A. and DUBEAU, H. Les Probiotiques. **Can. J. Microbiol.**, v. 39, p. 1095-1098, 1993.

SOUZA, C.; SOUZA, L. A. G. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev. Inst. Antib.**, v.13, n.1/2, p.85-87, 1973.

SPIEGEL, C. A. Bacterial vaginosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 485-502, 1991.

SWEET, R. L. Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 2, p. 271-275, 1995.

SWINGS, J. and DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol. Rev.**, v. 41, n.1, p. 1-46, 1977.

TAHRI, K.; GRILL, J. P.; SCHNEIDER, F. Involvement of thihydroxyconjugated bile salts in assimilation by *bifidobacteria*. **Curr. Microbiol.**, v.34, p. 79-84, 1997.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microfora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 527-33, 1998.

TORRES, K. B.; ALENCAR, A. X. E.; CAVALCANTI, K. P. S.; CARVALHO, F.; AZEVEDO-XIMENES, E. Tolerância da cultura de *Zymomonas mobilis* aos sais biliares e determinação de sua sensibilidade a diversos antimicrobianos. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2003, Florianópolis-SC, MM250 p. 209.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **Am. J. Cin. Nutr.**, v. 73, p. 393S-398S, 2001.

WANICK, M. C.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, E. C.; SCHUMACHER, I. E. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* (Lindner,1928) Kluyver e van Niel (1936). **Rev. Inst. Antib.**, v. 10, n. 1/2, p. 47-50, 1970.

WANICK, M. C.; SILVA, F. C. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis* **Rev. Inst. Antib.**, v. 1, n. 2, p. 69-71, 1971.

WARR, R.G.; GOODMAN; A. E; ROGERS, P.L.; SKOTNICKI, M.L. Isolation and characterization of productive strains of *Zymomonas mobilis*. **Microbios**, v.40, p. 71-78, 1984.

VASCONCELOS, J. C. S. N. **Avaliação da atividade antifúngica e padronização do liófilo da cultura de *Zymomonas mobilis***. 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) -Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RITCHTER, B.; FENSELAU, S.; LAVE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **Am. J. Nutr.**, v. 73, p. 421s-429s, 2001.

YABLONSKY, M. D.; GOODMAN, A. E.; STEVNSBORG, N.; GONÇALVES DE LIMA, O.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; LAWFOORD, H. G.; ROGERS, P. L.; EVELEIGH, D. E. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profiles. **J. Biotechnol.**, v. 9, p. 71-80, 1988.