

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Obtenção do Liófilo de *Zymomonas mobilis* (Lindner) DAUFPE 199 e
determinação de sua atividade bactericida frente a diferentes cepas
de *Escherichia coli*.

Cristiane Santos da Rocha

Recife – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Obtenção do Liófilo de *Zymomonas mobilis* (Lindner) DAUFPE 199 e
determinação de sua atividade bactericida frente a diferentes cepas
de *Escherichia coli*.

Cristiane Santos da Rocha

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Ciências Farmacêuticas
do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais
Orientadora: Prof Eulália Azevedo Ximenes

Recife – 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 30 de Maio de 2003.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de Maio de 2003 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores.

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Eulália Ximenes

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Maria de Fátima V. de Q. Sousa

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Alda de Andrade Chiapetta (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Alda Chiapetta

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor:

Prof. Dr. GERALDO JOSÉ MARQUES PEREIRA

Vice-reitor:

Prof. Dr. YONY DE SÁ BARRETO

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

Prof. Dr. PAULO ROBERTO FREIRE CUNHA

Diretor do Centro de Ciências da Saúde:

Prof. Dr. GILSON EDMAR GONÇALVES E SILVA

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde:

Prof. Dr. JOSÉ THADEU PINHEIRO

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêutica:

Profª. SILVANA CABRAL MAGGI

Coordenador de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas:

Prof. Dr. DAVI PEREIRA DE SANTANA

CRISTIANE SANTOS DA ROCHA

Obtenção do Liófilo de *Zymomonas mobilis* (Lindner) DAUFPE 199 e
determinação de sua atividade bactericida frente a diferentes cepas
de *Escherichia coli*.

BANCA EXAMINADORA:

Membro Externo Titular

Profa. Dra. Alda de Andrade Chiappeta

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Membros Internos Titulares

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria de Fátima Queiroz

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho com todo amor, carinho e respeito:

Aos meus pais, Henry Wilson A. da Rocha

e Maria Auxiliadora S. da Rocha;

As minhas irmãs Cristina Angélica e Clarissa S. da Rocha;

Aos meus avós, tios e tias;

Ao meu Inho, Cristiano Soares da Rocha;

Obrigada pela confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Nossa Senhora e Santa Rita de Cássia que me confortaram nos momentos de angústias e me deram a certeza de que tudo iria dar certo.

A Profª Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, pela orientação, apoio e amizade dedicados durante o dia-dia na realização deste trabalho.

A Drª Ana Albertina de Araújo pela participação nesse trabalho e amizade adquirida.

Aos colegas do mestrado: Ana Amélia Lira, Eduardo Gonçalves, Francisco Jaime Júnior, Roseane Maria Costa, Risonildo Cordeiro, Rosiel Santos, Sabrina Torres, Simone Bezerra, Thiago Aquino, Tereza Pedrosa, Valderes Almeida, Márcia Francisca Linhares, pela amizade conquistada durante todo o tempo que estivemos juntos.

A todos os professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pelas orientações e incentivo durante o curso.

Ao Prof Pedro Rolim, pelas sugestões referentes à parte do controle físico-químico do liófilo.

A Profª Alda de Andrade Chiappeta pela amizade e incentivo na minha vida profissional.

A farmacêutica Flávia Medeiros, pela realização do controle de qualidade do liófilo e dedicação a mim dispensada.

A minha grande amiga: Lúcia Roberta Filizola por toda amizade, força e coragem que serviram de exemplo.

Aos Colegas do Laboratório: Roberta Ferraz Rodrigues, Iêda Cristina Vicente, Daniela Marinho, José Antônio Albuquerque, Karen Penna, Renato Oliveira e em especial a minha grande amiga Fernanda Wellingrace Azevedo Silva.

A Mineo Nakazawa, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, pela ajuda no processo de liofilização.

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

A Secretária do Mestrado Iguacy Duque, por todo seu empenho e dedicação profissional.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, Departamento de Antibióticos da UFPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco e Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, por disponibilizarem os equipamentos e instalações físicas para que fosse possível a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos meus eternos amigos: Aurenice Lopes, Cleciene Fontes, Joana D'Arc Lins, Edvaldo Gadelha, Karina Dornelas, Evanise Andrade, José Marcos, Jovita Farias e Alciara Lima, pela amizade e compreensão nos momentos de minha ausência.

E para você meu amor, Cristiano Soares da Rocha, que é meu porto seguro, onde eu encontro tranquilidade e carinho, meus eternos agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Geral	17
2.2. Específicos	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1. Probióticos	18
3.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	23
3.3. <i>Escherichia coli</i>	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Microrganismos	33
4.1.1. Manutenção da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i>	33
4.1.2. Padronização do inóculo de <i>Zymomonas mobilis</i>	33
4.1.3. Fermentação da <i>Zymomonas mobilis</i> e obtenção do liófilo	33
4.2. Controle de qualidade do liófilo	34
4.2.1. Avaliação da pureza e da viabilidade celular do liófilo	34
4.2.2. Determinação do tempo de escoamento do liófilo	35
4.2.3. Determinação do ângulo de repouso do liófilo	35
4.2.4. Determinação do volume e densidade aparente do liófilo	35

4.2.5. Determinação do volume e densidade compactada do liófilo	36
4.2.6. Determinação microscópica da distribuição granulométrica das partículas do liófilo	36
4.2.7. Determinação da umidade residual do liófilo	37
4.3. Determinação da atividade antimicrobiana do liófilo de <i>Zymomonas mobilis</i>	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Caracterização em tecnologia farmacêutica do liófilo	38
5.2. Avaliação da atividade bactericida do liófilo de <i>Zymomonas mobilis</i>	42
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. ANEXO	58

LISTA DE ABREVIATURAS

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

pH – Potencial hidrogeniônico

CoA – Coenzima A

IL – Interleucina

μm – Micrômetro

dC – depois de Cristo

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

mm – Milímetro

mL – Mililitro

Mdal – Milidaltos

DAUFPE – Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

ATCC – American Type Culture Collection

mcg ou μg – Micrograma

g – Gravidade

g/L – grama por litro

AFNOR – Associação Francesa de Normatização

$\text{tg } \alpha 45^{\circ}$ – Tangente alfa de 45 graus

V_0 – Volume inicial

d_{ap} - Densidade aparente

$V_{500\text{cp}}$ – Volume de 500 compactações

$D_{500\text{cp}}$ – Densidade de 500 compactações

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

Log_{10} – Logaritmo decimal

IC – Isolado clínico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Controle de qualidade do liófilo de <i>Zymomonas mobilis</i>	39
Tabela 2 – Distribuição granulométrica das partículas do liófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> .	41
Tabela 3 – Atividade bactericida do liófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente as cepas de <i>Escherichia coli</i> .	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição granulométrica das partículas do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> .	40
Figura 2 – Atividade bactericida do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	43
Figura 3 – Atividade bactericida do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> IC 05.	43
Figura 4 – Atividade bactericida do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> IC 10.	43
Figura 5 – Atividade bactericida do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> IC 12.	44
Figura 6 – Atividade bactericida do líófilo de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> IC 15.	44

RESUMO

A industrialização de probióticos exige dos pesquisadores, o desenvolvimento de metodologias que assegurem a qualidade, a eficácia do produto e sobretudo a segurança do consumidor. Diante desta necessidade, o presente trabalho objetivou a obtenção de um líófilo padronizado a partir de uma cultura de *Zymomonas mobilis* e determinação de sua atividade bactericida sobre *Escherichia coli*, microrganismo comumente implicado em diversas infecções. A atividade bactericida do líófilo de *Z. mobilis* foi determinada pela avaliação da curva de morte versus tempo (Time Killing Curves), ao longo de 24 horas sobre uma cepa de coleção e quatro isolados clínicos de *Escherichia coli* cujo fenótipo de resistência aos β -lactâmicos fora previamente determinado. O líófilo de *Z. mobilis* apresentou estabilidade quanto às suas características microbiológicas e físico-químicas e demonstrou poder inibitório sobre o crescimento de todas cepas de *E.coli* nas primeiras horas de contato. Esta inibição foi prolongada até o final das 24 horas cujo decréscimo do inóculo foi em média da ordem de $2,68 \log_{10} \pm 0,63$. O líófilo de *Z. mobilis* possui especificações farmacopéicas e atividade bactericida sobre *Escherichia coli* o que nos credita a utilizá-lo no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

The effectiveness of the probiotics demands of the researchers methodologies that assure the quality of this product and the safety of the consumers. The aim of this study was to obtain a lyophile standardized from *Zymomonas mobilis* culture and to determine your bactericidal activity against *Escherichia coli*, microorganism commonly implicated in several infections. The bactericidal activity of the lyophile of *Z. mobilis* was evaluated by Time Killing Curves method against a collection strain and four clinical isolated of resistant *Escherichia coli* to some β -lactam antibiotic. The lyophile of *Z. mobilis* presented a fine powder and stable in microbiologicals, physical and chemistries characteristics. It shown active inhibing of the growth of *E. coli* in the first four hours. This inhibition was prolonged during of the experimentation, whose inoculum reduction was on average equal to $2,68 \log_{10} \pm 0,63$ after 24 hours. This results give credits to us to develop of pharmaceutical formulations.