



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

GABRIEL SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL PROBIÓTICO PARA CONTROLE DO
PATÓGENO ASSOCIADO A MASTITE BOVINA**

Recife

2024

GABRIEL SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL PROBIÓTICO PARA CONTROLE DO
PATÓGENO ASSOCIADO A MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientador (a): Prof. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Gabriel Santos da.

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL PROBIÓTICO PARA
CONTROLE DO PATÓGENO ASSOCIADO A MASTITE BOVINA / Gabriel
Santos da Silva. - Recife, 2024.

43 p. : il., tab.

Orientador(a): Gláucia Manoella de Souza Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Microrganismo. 2. Microencapsulação. 3. Infecção mamária. 4.
Zymomonas mobilis. 5. Probiótico. I. Lima, Gláucia Manoella de Souza .
(Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

GABRIEL SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL PROBIÓTICO PARA CONTROLE DO
PATÓGENO ASSOCIADO A MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 24 / 07 /2024

COMISSÃO EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
GLAUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA GOMES
Data: 18/02/2025 20:51:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a.Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima
(Orientadora) Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente
AMANDA MARIA DA SILVA
Data: 18/02/2025 23:41:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MSc. Amanda Maria da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente
ANA CLAUDIA ALCANTARA LEMOS
Data: 12/02/2025 17:49:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MSc. Ana Claudia Alcantara Lemos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2024

Dedico esse trabalho aos meus pais, Mirian Rodrigues e José Manoel;

Às minhas irmãs e sobrinhas;

À minha esposa, Brenda Wycória;

Obrigada pela confiança, parceria e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a finalização deste trabalho de conclusão de curso. Este projeto representou um marco significativo na minha jornada acadêmica e não teria sido possível sem o apoio e contribuição de muitas pessoas especiais.

Primeiramente, quero agradecer a Deus, sem ele me capacitando nada disso seria possível. Aos meus pais, Mirian Rodrigues da Silva e José Manoel Santos da Silva, e à minha irmã, Paloma de Cassia Rodrigues, agradeço por seu apoio incondicional. Sua compreensão, encorajamento e amor foram meu suporte durante toda a minha jornada acadêmica. Sem o apoio emocional de vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

À minha esposa, Brenda Wycória Santana do Sacramento, por todo apoio e incentivo durante esses longos anos juntos, ter acreditado em mim e ter sido o meu suporte, minha parceira da vida e dos estudos.

Também quero estender meus agradecimentos à minha orientadora, Gláucia Manoella de Souza Lima, pela orientação e paciência ao longo deste processo. Sua dedicação e feedbacks construtivos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de classe, Ariadne Beatriz, Alanis Trindade, Adrienny Daniely, Camila Vicente, Evelyne Vitória, Lucas Felix, Maria Clara, Maria Fernanda, Mirelle Cristina, Ramon Souza e Rhabersh Pascoal. Suas discussões, trocas de ideias e apoio foram essenciais para o enriquecimento do meu trabalho. Compartilhar conhecimento e experiências com vocês foi uma parte inestimável da minha formação enquanto estudante e futuro profissional.

A minha equipe de pesquisa do LABGEM que me acompanhou diariamente muito antes e durante o desenvolvimento deste trabalho, Nathali Gregorio, Rhabersh Pascoal e Karen Kathilyn às irmãs que a ciência me presenteou, foi prazeroso compartilhar e adquirir muitos conhecimentos com vocês.

Agradeço ainda a Universidade Federal de Pernambuco por fornecer a infraestrutura e os recursos necessários para a realização deste TCC. A biblioteca, sala de informática e o apoio técnico foram cruciais para a pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para este projeto, direto ou indiretamente. Sei que este é apenas o começo da minha jornada acadêmica e profissional.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

A mastite bovina é uma inflamação do tecido mamário que compromete a produção de leite e provoca alterações patológicas no gado leiteiro, sendo um de seus principais agentes infecciosos o *Staphylococcus aureus*. O tratamento envolve frequentemente o uso de antibióticos, porém o uso indiscriminado destes medicamentos leva ao desenvolvimento de cepas bacterianas multirresistentes e à presença de resíduos nos produtos lácteos. Dessa forma, os probióticos podem atuar de forma alternativa aos antibióticos se fornecidos em quantidades suficientes para promover seus benefícios ao hospedeiro. Diante disso, o trabalho teve como objetivo obter e caracterizar hidrogéis probióticos contendo a bactéria *Zymomonas mobilis* e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* isolados de mastite bovina. Foi desenvolvida uma formulação com quitosana a 2% utilizando o processo de coacervação simples, que demonstrou uma eficiência de microencapsulação de 102%. Após 90 dias, a viabilidade da formulação de *Z. mobilis* com quitosana a 2% se mantém com um log final de 10,00 UFC/mL. A caracterização da formulação quanto ao tamanho das partículas se manteve uniforme entre 2,27 μm e 2,34 μm ao longo do tempo. O índice de polidispersão de 0,466 a 0,467 e o potencial zeta de 46,6 mV a 63,9 mV em 30 dias, indicaram que o sistema é homogêneo, monodisperso e estável, A microscopia óptica confirmou a presença das culturas probióticas e a preservação de sua morfologia, sem contaminação. Nos testes de atividade antimicrobiana, *Z. mobilis* encapsulada demonstrou maior eficácia contra *S. aureus*, com halos de inibição variando de 12 mm a 26 mm, em comparação com o microrganismo livre. Esses resultados indicam que a formulação probiótica é eficiente, mantém sua viabilidade ao longo do tempo e apresenta atividade antimicrobiana promissora contra o patógeno associado à mastite bovina, sugerindo-se como uma alternativa aos antibióticos.

Palavras-chave: Microrganismo. Microencapsulação. Infecção mamária.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammation of mammary tissue that compromises milk production and causes pathological changes in dairy cattle, with one of its main infectious agents being *Staphylococcus aureus*. Treatment often involves the use of antibiotics, but the indiscriminate use of these drugs leads to the development of multi-resistant bacterial strains and the presence of residues in dairy products. Therefore, probiotics can act as an alternative if provided in sufficient quantities to promote their benefits to the host. Thus, this study aimed to obtain and characterize probiotic hydrogels containing the bacterium *Zymomonas mobilis* and evaluate its antimicrobial activity against *S. aureus* isolated from bovine mastitis. A formulation with 2% chitosan was developed using the simple coacervation process, which demonstrated a microencapsulation efficiency of 102%. After 90 days, the viability of the *Z. mobilis* formulation with 2% chitosan remained with a final log of 10.00 CFU/mL. The characterization of the formulation regarding particle size remained uniform between 2.27 μm and 2.34 μm over time. The polydispersion index from 0.466 to 0.467 and the zeta potential from 46.6 mV to 63.9 mV in 30 days indicated that the system is homogeneous, monodisperse, and stable. Optical microscopy confirmed the presence of probiotic cultures and the preservation of their morphology, without contamination. In antimicrobial activity tests, encapsulated *Z. mobilis* demonstrated greater efficacy against *S. aureus*, with inhibition halos ranging from 12 mm to 26 mm, compared to the free microorganism. These results indicate that the probiotic formulation is efficient, maintains its viability over time, and presents promising antimicrobial activity against the pathogen associated with bovine mastitis, suggesting it as an alternative to antibiotics.

Keywords: Microorganism. Microencapsulation. Mammary infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Sistema de suporte do úbere da vaca	18
Figura 2 –	Alvéolos e ductos formam o sistema secretor de leite	19
Figura 3 –	Ilustração de formas de microencapsulação com polímero encapsulante e material ativo (microcápsula e microesfera)	24
Figura 4 –	Cinética de <i>Zymomonas mobilis</i> AG-11 UFPEDA 198 log UFC/mL	33
Figura 5 –	Microscopia óptica <i>Zymomonas mobilis</i> livre	38
Figura 6 –	Microscopia óptica <i>Zymomonas mobilis</i> encapsulado	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros chaves para diagnóstico de mastite bovina	20
Tabela 2 –	Unidades formadoras de colônias (Log UFC/g média ± desvio padrão) antes e após o processo de encapsulação e eficiência de encapsulação (EE%)	34
Tabela 3 –	Viabilidade e estabilidade em Log UFC/g de <i>Zymomonas mobilis</i> (livre) e microencapsulada armazenada em temperatura refrigerada (5 °C).	35
Tabela 4 –	Análise da estabilidade da formulação de Hidrogel + probiótico quanto ao Tamanho da Partícula - Ø em (nm), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta - ζ em mV, após o preparo da formulação.	36
Tabela 5 –	Atividade antimicrobiana (mm) <i>Z.mobilis</i> (Livre) e <i>Z.mobilis</i> + quitosana 2% frente a <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina (UFPEDA 1067B a 1076B) e UFPEDA 02.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN - Agar Nutrientes

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

D.O - Densidade Óptica

EE - Eficiência de Encapsulamento

g/L - gramas por Litro

mL - mililitro

mm - milímetro

nm - nanômetro

PM - Peso molecular

Qui2% - Quitosana 2%

S.aureus - *Staphylococcus aureus*

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

Zyl *Z.mobilis* - *Zymomonas mobilis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 INDÚSTRIA LEITEIRA	16
2.2 MASTITE BOVINA	17
2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA MASTITE	20
2.5 PROBIÓTICOS	21
2.6 <i>Zymomonas mobilis</i>	22
2.7 MICROENCAPSULAÇÃO	24
2.8 QUITOSANA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVOS GERAIS	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1 ATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO	28
4.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	28
4.3 PREPARAÇÃO DA CULTURA PROBIÓTICA E MICROENCAPSULAÇÃO	29
4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	30
4.5 VIABILIDADE E ESTABILIDADE	30
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	31
4.6.2 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)	31
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
4.7.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS LIVRES	31
4.7.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS ENCAPSULADAS	32
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	33
6.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	34
6.3 VIABILIDADE E ESTABILIDADE	35
6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	36
6.4.1 TAMANHO DE PARTÍCULA (POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO)	36
6.4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA	38
6.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PROBIÓTICO LIVRE E ENCAPSULADO	39
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

O setor de produção de leite e seus derivados é de significativa importância econômica e social no Brasil, recebendo uma atenção especial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O Brasil ocupa a terceira posição no ranking dos maiores produtores de leite do mundo, com uma produção anual que ultrapassa 34 bilhões de litros. Essa produção está distribuída em cerca de 98% dos municípios brasileiros e caracterizada pela predominância de pequenas e médias propriedades rurais. Além disso, o setor emprega aproximadamente 4 milhões de pessoas (MAPA.,2024).

O país abriga mais de 1 milhão de propriedades dedicadas à produção de leite, e as projeções do agronegócio, conforme divulgadas pela Secretaria de Política Agrícola, indicam que até 2030, irão prosperar os produtores que demonstrarem maior eficiência na adaptação à nova realidade tecnológica, melhoria na gestão e aprimoramento tanto técnico quanto econômico (MAPA., 2024).

Pernambuco se encontra em segunda posição como maior produtor de leite na região Nordeste, produzindo cerca de 1,17 bilhão de litros, destacando-se em 2022 com um aumento significativo em sua produção de 16,5%. Segundo dados de pesquisas da pecuária municipal emitidos pelo IBGE, esse aumento representa R\$ 2,3 bilhões e a produção acumula cerca de 60,64% do valor total apurado com produtos de origem animal (Nordeste.,2024).

Na pecuária leiteira e nas indústrias de laticínios, *Staphylococcus aureus* representa uma preocupação significativa devido à sua alta capacidade patogênica, que pode resultar no desenvolvimento de mastite bovina. Esta condição não apenas compromete a qualidade e integridade do leite, mas também eleva os custos associados ao tratamento da infecção (Rainard *et al.*, 2018).

A mastite bovina é caracterizada por uma infecção do parênquima mamário que acomete grande parte dos rebanhos leiteiros, sendo que a maior incidência dos casos é de etiologia bacteriana, mas pode ocorrer também por infecção fúngica (Franco *et al.*, 2022).

Para controlar essa infecção é crucial adotar medidas de higiene rigorosas antes, durante e após a ordenha. A contaminação da glândula mamária pode resultar de uma variedade de bactérias, mas principalmente *Staphylococcus aureus*,

exigindo assim o uso de antibióticos. Entretanto, o uso frequente de medicamentos pode deixar resíduos no leite, os quais não são eliminados pelo processo de pasteurização e representam um potencial risco para a saúde do consumidor. Além disso, a utilização indiscriminada dos antibióticos pode resultar na resistência bacteriana, comprometendo a eficácia dos tratamentos empregados (Holko *et al.*, 2019).

Desta forma, os probióticos podem atuar de forma alternativa no controle da mastite bovina uma vez que atuam gerando benefícios ao hospedeiro além de atuar como inibidores de bactérias patogênicas. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, podem melhorar a qualidade de vida e exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Swanson *et al.*, 2020). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que um produto probiótico tenha uma concentração de 10^8 a 10^9 UFC/mL (Ramlucken *et al.*, 2020).

Fornecer às células vivas probióticas uma barreira física contra condições ambientais adversas é uma abordagem que atualmente recebe considerável interesse. As tecnologias de microencapsulação são consideradas uma perspectiva promissora para aplicação de bactérias probióticas viáveis, visto que a matriz de encapsulamento pode fornecer uma barreira física contra condições ambientais adversas (Chávarri *et al.*, 2010).

A utilização de sistemas de liberação controlada de organismos probióticos é considerada promissora devido à sua capacidade de manter a viabilidade e estabilidade dos microrganismos, garantindo sua eficácia. No entanto, a literatura é escassa em relação aos probióticos encapsulados destinados ao tratamento da infecção do parênquima mamário. Desta forma, o presente trabalho visa atuar de forma inovadora utilizando uma cepa bacteriana probiótica encapsulada com revestimento de quitosana a 2%, para testar frente ao patógeno associado à mastite bovina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INDÚSTRIA LEITEIRA

A cadeia produtiva do leite representa uma das principais forças econômicas do Brasil, desempenhando um papel significativo na geração de empregos e renda. Presente em quase todos os municípios do país, envolve mais de um milhão de produtores rurais, além de criar milhões de empregos em setores correlatos. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite, com mais de 34 bilhões de litros anualmente. (MAPA, 2024).

O setor mundial de produtos lácteos foi afetado pela pandemia que ocorreu entre o ano de 2020 e 2023. No entanto, os impactos foram menos significativos do que as projeções sugeridas por 370 especialistas durante uma conferência pós-pandemia Covid-19 organizada pela International Farm Comparison Network (IFCN). A pandemia não causou apenas problemas para o setor, mas também gerou novas oportunidades que englobam os produtores, as indústrias e os consumidores (CILEITE, 2020).

Nas últimas duas décadas, a produção de leite cresceu quase 80%, enquanto o número de vacas permaneceu praticamente constante, graças ao incremento da produtividade do rebanho. Houve uma significativa redução no número de produtores e uma maior intensificação dos sistemas de produção. A incorporação de novas tecnologias tem sido tanto um desafio quanto um estímulo para esse aumento na produtividade dos animais (EMBRAPA, 2020).

O potencial da pecuária leiteira no Brasil é notável, especialmente considerando dados reportados pelo IBGE em que a Região Nordeste vem aumentando sua produção de leite devido às condições climáticas que são favoráveis se posicionando como terceiro maior produtora nacional, antecedendo a Região Sul que lidera o ranking de produção em 33,8%, seguido pela Região Sudeste com 33,6% (Pecuária Leiteira, 2024)

Considerando a relevante importância da pecuária leiteira no contexto nacional, torna-se essencial identificar os gargalos de produção que resultem em prejuízos significativos para os produtores. Este processo visa promover a saúde e o bem-estar dos profissionais e animais, assegurar a preservação do ambiente além

de garantir a qualidade do produto final. É importante destacar que os protocolos de biossegurança, associados à saúde dos rebanhos produtores, têm adquirido crescente relevância no cenário da produção leiteira nacional (Brasil, 2020; Embrapa, 2020).

Dentre os gargalos produtivos enfrentados pela pecuária leiteira e indústrias de laticínios, *Staphylococcus aureus* representa uma preocupação significativa devido à sua alta capacidade patogênica, que pode resultar no desenvolvimento de mastite bovina, comprometendo a qualidade e integridade do leite além de elevar os custos associados ao tratamento da infecção por meio de antibióticos, resultando em resistência bacteriana além de baixa produção e descarte do leite (Rainard *et al.*, 2018).

2.2 MASTITE BOVINA

A mastite é uma inflamação do tecido do úbere que afeta a produção de leite e traz alterações patológicas como inchaço, dor, edema, inflamação e fibrose do úbere. Em vários casos, as infecções associadas a bactérias são a apresentação mais prevalente nos rebanhos (Ndahetuye *et al.*, 2019). A mastite bovina é uma infecção complexa e pode ser classificada em dois tipos, mastite clínica e mastite subclínica. A mastite clínica, pode ser superaguda, aguda e subaguda, dependendo da gravidade dos sintomas do hospedeiro.

A mastite clínica é uma condição agravada da doença e pode incluir sintomas locais e gerais no corpo do animal, como vermelhidão, inflamação, aumento da temperatura corporal, redução da produção de leite e alteração em sua composição. Em sua forma mais grave, podem ser observadas secreções e coágulos sanguíneos nas tetas da vaca (Cobirka *et al.*, 2020).

A mastite subclínica pode ser considerada uma manifestação mais silenciosa da doença, onde a glândula mamária aparenta externamente condições normais, porém está internamente comprometida. Uma das principais formas de identificar a mastite subclínica é por meio da contagem de células somáticas, além disso, o aumento bacteriano no leite, a diminuição da produção do leite e a alteração em sua composição são indicadores de mastite subclínica (Cobirka *et al.*, 2020).

A taxa de cura da mastite é influenciada pelas espécies de patógenos responsáveis e pela eficácia dos antibióticos utilizados, bem como o estado

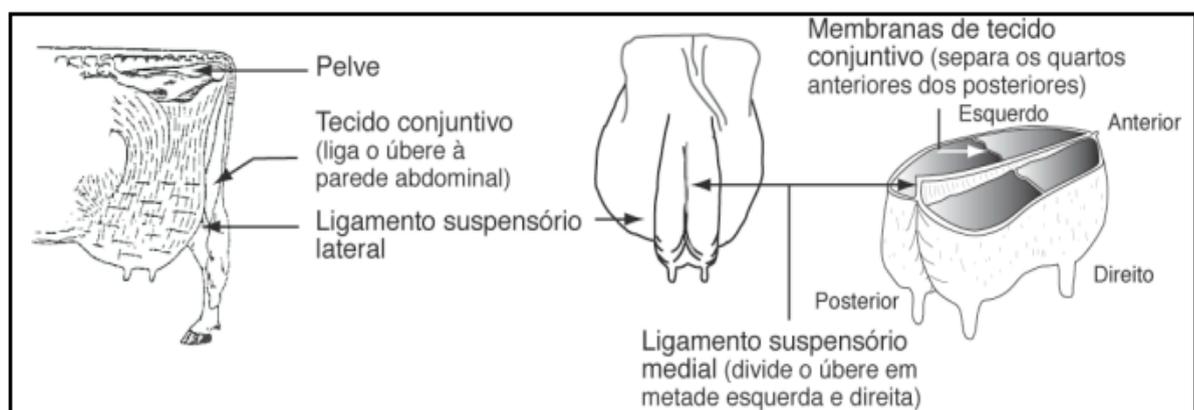
imunológico do hospedeiro. No entanto, o uso inadequado de antibióticos frequentemente resulta no desenvolvimento de resistência antimicrobiana, representando uma ameaça ao bem-estar do gado leiteiro. Além disso, há riscos significativos para a saúde pública devido à propagação de infecções bacterianas e à presença de resíduos de medicamentos no leite cru de vacas tratadas com antibióticos (Humayun *et al.*, 2022; Khairullah *et al.*, 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em lista divulgada em 2024, *Staphylococcus aureus* está entre as 15 bactérias que são consideradas ameaças globais por apresentarem grande resistência a antibióticos. A infecção da mastite bovina associada a esse patógeno apresenta baixo índice de cura considerando sua ágil infecção nos alvéolos do teto, além da sua persistência a classes diversas de antibióticos (Molineri *et al.*, 2021).

2.3 ANATOMIA DO ÚBERE BOVINO E RESPOSTA IMUNE

A glândula mamária de bovinos é dividida em quatro quartos mamários (Figura 1), cada um composto por uma glândula e uma teta. A glândula é responsável pela produção e armazenamento do leite, sendo composta por lóbulos, ductos menores e maiores, cisterna da glândula e teta. A teta inclui a cisterna do teto, a roseta de Fürstenberg, o esfíncter e o canal do teto (Fonseca, 2019).

Figura 1 : Sistema de suporte do úbere da vaca

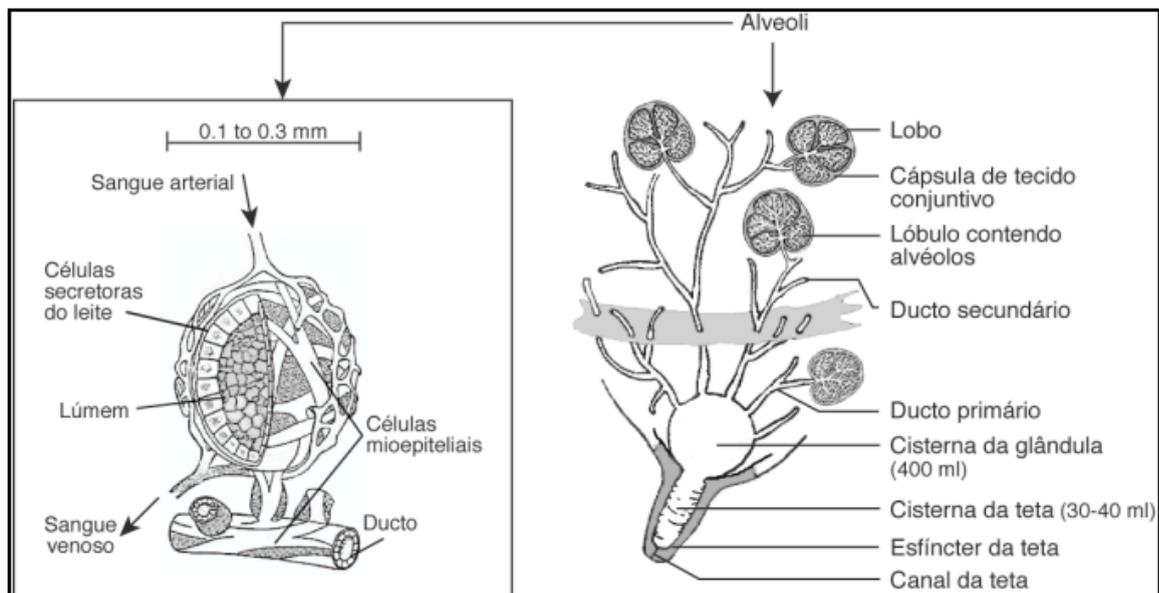


Fonte: Wattiaux, 2020.

O orifício do teto é composto pelo esfíncter (Figura 2), que possui uma musculatura lisa responsável por manter o canal do teto fechado e impedir o fluxo do leite. Além disso, esta função evita que patógenos penetrem neste canal. O

revestimento da teta produz o tampão de queratina, que tem ação bacteriostática devido sua composição química, o que promove ainda mais proteção contra a migração de bactérias patogênicas para as cisternas da glândula. Entretanto, lesões físicas na teta a tornam ainda mais vulnerável à invasão bacteriana, colonização e infecção devido a danos na queratina ou nas membranas mucosas que revestem o úbere (Cardozo *et al.*, 2017).

Figura 2: Alvéolos e ductos formam o sistema secretor de leite



Fonte: Wattiaux, 2020.

A inflamação mamária associada ao *Staphylococcus aureus* pode provocar uma reação imune, frequentemente retardada ou até mesmo não aparente. Estudos adicionais sugerem que esse comportamento específico da resposta imune na glândula mamária pode ser atribuído à ativação do receptor Toll-Like (TLR) por bactérias Gram-negativas. Enquanto as bactérias Gram-positivas não desencadeiam a mesma resposta de sinalização do TLR, resultando em uma resposta imune mais lenta ou moderada por parte do sistema imunológico do hospedeiro (Petzl *et al.*, 2018; Rohmeier *et al.*, 2020).

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA MASTITE

O diagnóstico precoce e o início do tratamento de forma adequada de casos de mastite é fundamental devido ao surgimento repentino da infecção. No tratamento deve ser considerado todo processo de manejo da ordenha, pois um aumento significativo em casos de infecção desta doença é um indicativo que há uma inadequação na forma de execução desses processos (Embrapa, 2021).

A contagem de células somáticas (CCS) se apresenta de forma quantitativa, onde se mede o número de células somáticas por mililitro de leite. Esta ferramenta monitora a persistência da mastite subclínica no rebanho e oferece ao produtor a possibilidade de identificação dos animais, que estão infectados e viabiliza estratégias para estimar perdas de produção leiteira e conseqüentemente danos econômicos. A alta contagem de células somáticas é um alerta da presença da inflamação mamária (Fernandes, 2020).

O California Mastitis Test (CMT) é um teste chave no diagnóstico da mastite subclínica que se destaca pela sua praticidade de aplicação em campo. Para sua execução é utilizado detergente aniônico neutro, como reagente, onde o composto lisa a membrana das células presentes na amostra liberando o conteúdo interno da célula que se apresenta de forma mais viscosa e os resultados são avaliados em escores de acordo com o grau de viscosidade do gel (Tabela 1), sendo eles: negativo, suspeito, +, ++ e +++ (Azevedo, 2023).

Tabela 1: Parâmetros chaves para diagnóstico de mastite bovina.

Escore CMT	Reação/Viscosidade	CCS(X 1000 Cels/mL)
Negativo	Ausente	0 - 200
Suspeito	Leve	150 - 500
+	Leve/Moderado	400 - 1500
++	Moderado	800- 5000
+++	Intensa	> 5000

Fonte: Autor (2024).

O teste mais eficiente para detectar mastite clínica é o da caneca telada ou de fundo escuro que faz a identificação nos primeiros jatos de leite. Quando a mastite clínica está presente, há um acúmulo de leucócitos no canal da teta, que formam grumos visíveis. Esses jatos iniciais devem ser coletados em uma caneca de fundo escuro ou telada, onde os grumos se tornam mais visíveis. O contraste entre o fundo

da caneca e os grumos facilita a visualização, confirmando a presença de mastite clínica (Clock *et al.*, 2021).

Um dos métodos principais para o tratamento da mastite bovina é a infusão de antibióticos diretamente nas glândulas mamárias. No entanto, esse tratamento apresenta um problema significativo para a produção de leite, pois os animais tratados com antibióticos precisam ser isolados, ficando fora da cadeia produtiva e resultando em um grande desperdício de leite. Como alternativas terapêuticas, o uso de bacteriófagos e probióticos têm sido sugeridos como eficazes (Angelopoulou *et al.*, 2019; Sharun *et al.*, 2021).

2.5 PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, podem melhorar a qualidade de vida e exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Swanson *et al.*, 2020). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que um produto probiótico tenha uma concentração de 10^8 a 10^9 UFC/mL (Ramlucken *et al.*, 2020).

Segundo a Food and Drug Administration (FDA), para ser um probiótico precisam ser reconhecidos como Generally Recognized as safe (GRAS) e conforme a Autoridade de Segurança alimentar Europeia (EFSA) é preciso que a identidade taxonômica do microrganismo e sua potencial patogenicidade sejam bem estabelecidas.

Os probióticos operam por exclusão competitiva, que se refere a capacidade dessas bactérias obterem vantagens na competição por receptores locais específicos no trato gastrointestinal em comparação com outras espécies bacterianas. Entretanto, a maioria das vias específicas e os principais mecanismos dos probióticos ainda são desconhecidos. A redução de pH, competição por nutrientes, produção de bacteriocinas e ácidos são os principais mecanismos sugeridos para a exclusão competitiva de patógenos (Monteagudo-mera *et al.*, 2019).

Existem diversos estudos sobre diferentes cepas probióticas com viés positivo para atribuir benefícios à saúde humana, no entanto, a busca por novas estirpes probióticas continua a ser uma alternativa viável, considerando os benefícios significativos que proporcionam a saúde do hospedeiro, como: controle da

microbiota intestinal, modulação da função imunológica, produção de ácidos orgânicos e compostos antimicrobianos (Sanders *et al.*, 2019).

2.6 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, não patogênica e anaeróbia facultativa. Suas células têm formato de bastonetes, medindo entre 2 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,4 µm de diâmetro. Elas podem ocorrer isoladamente ou em pares, não formam esporos nem cápsulas. Normalmente, é móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos que se agrupam em uma ou ambas as extremidades da célula. Seu crescimento em meio de cultura sólido é viscoso, de cor branca cremosa (Swings e De Ley, 1977).

Os primeiros trabalhos científicos sobre *Zymomonas mobilis* estão associadas a uma condição chamada doença da sidra, relatada inicialmente por Lloyd em 1903, na Inglaterra. Essa condição era comum em fermentações de suco de maçã e se caracterizava pela presença de ácido sulfídrico, formação de CO₂ e alta concentração de acetaldeído, que resultava em uma mudança desagradável no aroma, redução da doçura e turvação do suco (Swings e De Ley, 1977; Sahm *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos presentes na literatura avaliam amplamente o elevado potencial fermentativo de *Z. mobilis*, que permite produzir etanol a uma velocidade considerável de três a quatro vezes maior do que *Saccharomyces cerevisiae* (Pagane *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2015). O etanol é gerado na etapa final da via fermentativa, através da redução reversível do acetaldeído, catalisada pela isoenzima álcool Desidrogenase (Sreekumar *et al.*, 1999).

Desde 1950, pesquisadores do Departamento de Antibióticos na Universidade Federal de Pernambuco desempenham projetos de pesquisa com *Zymomonas mobilis* sugerindo a utilização do seu fermentado para tratamentos de infecções como enterocolite e cistite, obtendo uma diminuição dos sintomas por meio do seu uso terapêutico (Paula Gomes., 1959 apud Gonçalves de Lima, 1975).

Alguns estudos, nas últimas décadas, vêm analisando as características probióticas de diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* com análises *in vitro/in vivo* e tem-se obtido resultados promissores, onde essas linhagens apresentam

capacidade de sobrevivência em pH ácido, atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas e se comportam como uma bactéria segura para consumo, pois não é patogênica e nem tóxica (Santos *et al.*, 2004; Azerêdo *et al.*, 2010; Mesquita, 2008).

Mesquita (2008) analisou as características probióticas de uma cepa de *Z. mobilis* e atestou suas características *in vitro*, onde a linhagem testada apresentou tolerância em pH superior a 2,5, além de atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Salmonella choleraesuis*. Além disso, foi avaliada sua ação *in vivo* utilizando camundongos e atestando que a bactéria probiótica não penetra na corrente sanguínea e não causa alterações morfológicas em rins, fígado e baço desses animais.

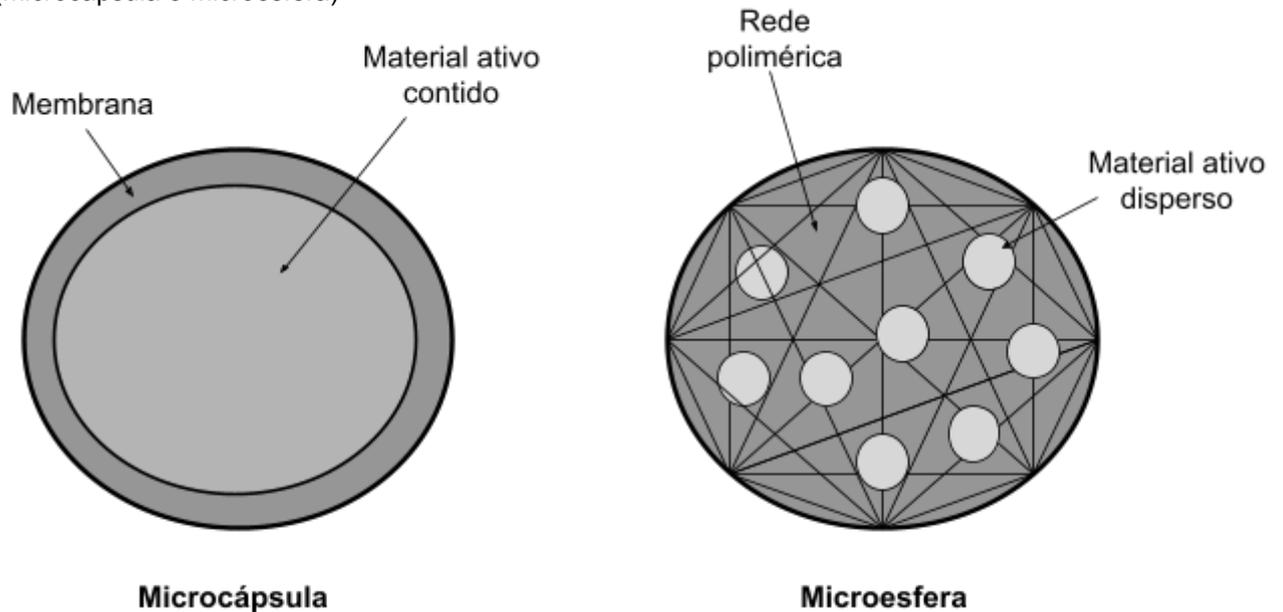
A literatura é escassa quanto às análises do potencial probiótico de *Zymomonas mobilis*, focando seus estudos para outros vieses. No entanto, *Z. mobilis* é reconhecida como GRAS (do inglês Generally Recognized as Safe) e apresenta características relevantes para a produção de probióticos exigida pela Food and Drug Administration (FDA). Atualmente, os grupos de pesquisa de *Z. mobilis* presente no Departamento de Antibióticos avaliam suas características probióticas tanto *in vitro* quanto *in vivo* e suas possíveis aplicações para o mercado.

2.7 MICROENCAPSULAÇÃO

O processo de encapsular, revestir ou envolver uma gota muito pequena de partículas, como sólidos, líquidos ou mesmo gás, com uma partícula polimérica é conhecido como microencapsulação (Harshitha *et al.*, 2023). Além de garantir a estabilidade e integridade das propriedades funcionais do microrganismo encapsulado, este processo permite a liberação controlada de compostos ativos e protege-o contra condições externas adversas. Isso resulta em uma eficácia prolongada e consistente deste processo (Carvalho *et al.*, 2018).

No processo de microencapsulação, podem ser geradas micropartículas que assumem a forma de microcápsulas ou microesferas (Figura 3).

Figura 3: Ilustração de formas de microencapsulação com polímero encapsulante e material ativo (microcápsula e microesfera)



Fonte: Autor (2024).

As microcápsulas são partículas onde o componente ativo está rodeado por uma camada do agente encapsulante. Por outro lado, as microesferas são micropartículas em que o material ativo está distribuído por toda a matriz, composta de um material homogêneo. Nesse caso, o material encapsulado pode ser integrado à matriz polimérica através de adsorção ou por meio de ligações covalentes (Comunian *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas de microencapsulação, a coacervação é muito utilizada para preparação de microesfera, podendo ser classificada em coacervação simples onde o polímero utilizado é solubilizado e um soluto é inserido formando um produto final insolúvel precipitado e coacervação complexa onde a micropartícula será formada pela interação interiônica entre polímeros de cargas opostas. Apesar de ser uma técnica mais antiga, ainda é muito utilizada atualmente devido sua eficiência (Cristina, 2022).

2.8 QUITOSANA

A quitosana é um polímero catiônico obtido pela desacetilação da quitina, encontrado abundantemente em exoesqueletos de crustáceos, insetos, artrópodes e

moluscos. O processo de obtenção de quitina pelo método de extração química compreende as etapas de desproteinização, desmineralização e descoloração. Para obter a quitosana é necessária a desacetilação da quitina. Esses polímeros também podem ser extraídos através do método de extração biológica envolvendo o uso de microrganismos (Santos *et al.*, 2020).

O método de extração biológica envolve a utilização de microrganismos que produzem enzimas e ácidos orgânicos a um custo relativamente baixo, com um processo mais limpo e ecológico, favorecendo a produção de quitina de qualidade. Este processo de extração tem se tornado mais atrativo pela obtenção de produtos de alta qualidade, com custo de produção acessível e não gerando efluentes químicos de alta concentração. Os métodos biológicos frequentemente usados para extração de quitina são a desproteinização enzimática e a fermentação usando microrganismos. (Liu *et al.*, 2020).

A desproteinização enzimática dos resíduos da indústria pesqueira para a obtenção de proteína hidrolisada é um método baseado na adição de enzimas para fragmentar as proteínas. Essa abordagem apresenta a vantagem de não gerar produtos de degradação ambiental. As proteases desempenham um papel fundamental na remoção de proteínas durante a extração de quitina dos resíduos da indústria pesqueira. As principais proteases envolvidas nesse processo são a papaína, tripsina, pepsina, alcalase e pancreatina (Marzieh *et al.*, 2019).

A obtenção de proteínas hidrolisadas pode ser realizada por enzimas proteolíticas produzidas por bactérias lácticas ativadas devido ao baixo pH do ambiente. Esse método oferece a vantagem de possibilitar a recuperação de subprodutos de valor agregado, como proteínas, enzimas e pigmentos, com aplicações potenciais na indústria alimentícia. A eficácia desse processo fermentativo com microrganismos depende de fatores como a quantidade de inóculo, a concentração de glicose no meio de cultivo, o pH durante o crescimento e o tempo de fermentação. Esta abordagem de extração utilizando microrganismos está se tornando uma tendência nas pesquisas de biotecnologia e biorremediação, e pode ser realizada utilizando bactérias produtoras de proteases (Ter *et al.*, 2023).

Quando o grau de desacetilação da quitosana atinge cerca de 50%, ela se torna solúvel em meio aquoso ácido. Ao ser dissolvida em um ambiente ácido, os

grupos amino da cadeia recebem prótons, resultando em um polímero com carga catiônica. Essa característica permite que a quitosana interaja com uma variedade de moléculas, tornando-a o único polissacarídeo marinho com essa propriedade catiônica. Além disso, acredita-se que essa carga positiva seja responsável pela atividade antimicrobiana da quitosana, pois ela interage com as membranas celulares dos microrganismos, que geralmente possuem carga negativa (Muxika *et al.*, 2017).

A quitosana possui propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, sendo aplicada nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, biomédica, química e têxtil. Além disso, a quitosana e seus derivados podem ser utilizados na forma de géis, esferas, membranas, filmes e esponjas, dependendo de sua aplicação (Santos *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Obter e caracterizar hidrogéis probióticos contendo a bactéria probiótica *Zymomonas mobilis* e avaliar atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e avaliar a viabilidade, estabilidade e eficiência da formulação do hidrogel probiótico;
- Caracterizar o hidrogel quanto às propriedades das microcápsulas;
- Avaliar a atividade do probiótico livre e encapsulado na inibição de cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina;

4. METODOLOGIA

4.1 ATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO

As culturas-testes foram cedidas pela Coleção de Microrganismo UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Para reativação da bactéria probiótica, inicialmente foram preparados meio de cultura caldo SSDL, (Extrato de levedura 5g/L; Glicose Anidra 20g/L). Posteriormente 1 ml de culturas-estoque da cepa probiótica foi incorporado para sua ativação. O inóculo foi incubado a 30 °C por 24h em incubadora BOD (Swings e Deley, 1976).

Para reativação de *Staphylococcus aureus*, foram utilizadas 10 cepas isoladas de mastite bovina (UFPEDA 1067B-1076B) e uma cepa padrão UFPEDA 02, ambas depositadas na Coleção de Microrganismos, a cultura foi inoculada em Caldo nutriente (Extrato de carne bovina 3 g/L, Peptona 10g/L) incubado a 37 °C por 24h, sendo posteriormente semeada em meio Agar Nutriente (Extrato de carne bovina 3 g/L; peptona 10 g/L; Agar 15/L) e mantida nas mesmas condições de incubação.

4.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para a análise da cinética de crescimento da cepa de *Zymomonas mobilis* (AG-11 UFPEDA 198), adotou-se a metodologia descrita por Lima *et al* (2011) com algumas modificações.

Inicialmente, a cepa foi cultivada em meio caldo SSDL por um período de 24h a 30 °C. Para a preparação do inóculo, adicionou-se 10 mL do pré-inóculo a um volume de 90 mL de meio caldo SSDL (Extrato de levedura 5g/L; Glicose Anidra 20g/L). Para monitorar a cinética de crescimento dos inóculos ao longo do processo, foram coletadas alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo específicos em um período de 48 horas (0h; 3h; 6h; 9h; 12h; 15h; 18h; 21h; 24h; 27h; 30h; 33h; 36h; 39h; 42h; 45h; e 48h). Estas alíquotas foram então analisadas quanto à sua absorbância utilizando um espectrofotômetro padronizado em um comprimento de onda de 625 nm. Para a determinação do número de células viáveis, foram realizadas diluições seriadas variando de 10^{-2} a 10^{-12} .

Posteriormente, 100 µL das diluições pré-estabelecidas dentro deste parâmetro de diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar

SSDL (Extrato de levedura 5g/L; Glicose Anidra 20g/L; Agar 15g/L) , utilizando o método de espalhamento , com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram então incubadas por um período de 72h. O número de células viáveis e a cinética de crescimento, foram estimadas pela contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Os testes foram realizados em triplicata, visando análises posteriores dos resultados.

4.3 PREPARAÇÃO DA CULTURA PROBIÓTICA E MICROENCAPSULAÇÃO

Para preparação da cultura probiótica, o meio de cultura caldo SSDL (Extrato de levedura 5g/L; Glicose Anidra 20g/L) foram preparados. Logo após foi distribuído 9 ml em tubos ao qual foi adicionado uma grama do liofilizado de *Z. mobilis* para sua ativação, o inóculo foi armazenado durante 24h a 30 °C (Swings e Deley, 1976).

Posteriormente, as células foram separadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 min, o pellet foi lavado duas vezes em solução salina a 0,9%. A biomassa resultante de *Z. mobilis* foi ressuspensa em 5 ml de meio de cultura até alcançar uma concentração final de 11 log UFC/mL quando plaqueado em meio Agar SSDL. Essa suspensão foi utilizada no processo de microencapsulação e nos ensaios com células livres.

1 mililitro da suspensão celular final contendo 11,11 log UFC/mL foi transferido para um Erlenmeyer contendo 140 mL de caldo SSDL, sendo incubado em estufa a 30 °C por 24 horas. O inóculo da bactéria probiótica foi repassado para tubos Falcon de 50 mL e, posteriormente, centrifugados (modelo SORVALL SUPER T 21) a 5.000 rpm por 10 minutos para a separação total da biomassa.

Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em falcon contendo meio de cultura SSDL caldo. Para preparação do hidrogel de quitosana de baixo peso molecular a 2%, foi inicialmente preparado uma solução de ácido acético glacial a 1% e pesado 0,2 gramas de quitosana de baixo peso molecular (Sigma).

A concentração de quitosana foi posta em um becker contendo 10 mL de ácido acético glacial, e submetida à homogeneização em MICRO TRITURADOR TURRATEX a 14.000 rpm até completa solubilização e, posteriormente, a solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos (Farias, 2017). Posteriormente, 5 ml do inóculo de *Z. mobilis* foi adicionado a 5ml da solução de quitosana de baixo peso molecular de 2%, e submetido ao vórtex para homogeneidade completa da amostra.

4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

No processo de microencapsulação, conforme descrito por Chaverri *et al.*, (2010), foi avaliada a sobrevivência dos microrganismos após o processo de encapsulação.

Duas gramas das micropartículas probióticas, foi adicionada em 4,5 mL de solução de citrato de sódio 1,5% (p/v), em seguida, submetidas ao vórtex por 1 minuto para liberar as células que estavam aprisionadas no hidrogel. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução salina esterilizada 0,9% e, posteriormente, os tubos com o hidrogel e com células livres, foram submetidos as diluições seriadas, onde foi retirado 100 µL para realizar a contagem de células viáveis.

A análise foi feita em triplicata, utilizando o meio de cultura ágar SSDL pela técnica de "spread plate". As placas foram incubadas por 48h a 30 °C e submetidas à contagem de unidades formadoras de colônias. A eficiência foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\%EE=(N/N0)\times 100$$

Onde N representa o número de células liberadas das cápsulas (UFC/mL) e N0 é o número de células vivas usadas para encapsulamento (UFC/mL).

4.5 VIABILIDADE E ESTABILIDADE

Uma alíquota de 1 mL de células livres e do probiótico microencapsulado, separadamente, foram suspensas em 9 mL de solução salina esterilizada 0,9% e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-8} e 100 µL das diluições foram plaqueadas em meio de cultura ágar SSDL, incubadas a 30 °C por 48 horas para determinação do número de células viáveis. Essa avaliação foi realizada nos dias 0, 10, 20, 30 e 60 . As amostras foram armazenadas em temperatura refrigerada 5 °C e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A caracterização do microencapsulamento foi realizada por meio da análise do tamanho das micropartículas, índice de polidispersão, potencial zeta e microscopia óptica.

4.6.1 TAMANHO DE PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O diâmetro médio dos hidrogéis de quitosana a 2% contendo *Z. mobilis* foi mensurado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do tamanho de partícula (\emptyset), 10 μL das formulações foram diluídos em 990 μL de água ultrapurificada (Milli Q®, Millipore, USA).

As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico (nm). A carga de superfície das nanopartículas foi estabelecida pela determinação do potencial zeta (ζ). Para medição do ζ houve a diluição de 10 μL das amostras em 990 μL de água purificada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

4.6.2 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

A caracterização da morfologia do hidrogel contendo o probiótico e a célula livre foi realizada por um microscópio óptico, onde 10 microlitros da amostra foram postos sobre lâmina e submetido ao processo de coloração de Gram, posteriormente visualizado e fotografado por smartphone.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS LIVRES

Inicialmente, *Z. mobilis* de forma livre foi cultivada em caldo SSDL (Extrato de levedura 5g/L; Glicose Anidra 20g/L) a 30 °C por 24 horas. As culturas de *S.aureus* (UFPEDA 1067B-1076B) isoladas de mastite bovina e a cepa padrão de *S.aureus* UFPEDA 02 foram cultivadas em Ágar nutriente (Extrato de carne bovina 3g/L; peptona 10g/L; Agar 18g/L) posteriormente foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foram preparadas suspensões padronizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, sendo realizada diluição em solução salina 0,9% a fim de obter a concentração de 10^6 UFC/mL de todas as cepas de *S.aureus*. Com o auxílio de um swab foi semeada em placas de ágar SSDL.

Posteriormente, 10 μ L (10^8 UFC/mL) do fermentado de *Z. mobilis* foi depositado sobre um ponto previamente demarcado nas placas de Petri contendo ágar SSDL e incubadas a 30 °C em incubadora BOD durante as primeiras 24 horas e após esse período, incubadas a 37 °C por mais 24 horas. O antagonismo foi observado pela formação de um halo de inibição no entorno de cada colônia de *Z. mobilis* (Lima, 2011).

4.7.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS ENCAPSULADAS

A atividade antimicrobiana dos hidrogéis foi determinada pelo método de difusão em ágar (Hadacheck e Greger, 2000), modificado. As suspensões contendo as cepas de *S.aureus* foram padronizadas em espectrofotômetro em 625 nm (D.O 0,08-0,13), equivalente aproximadamente a 10^8 UFC/mL.

Posteriormente, foram realizadas diluições em solução salina 0,9% a fim de obter a concentração de 10^6 UFC/mL de todas as cepas de *S.aureus*. Com o auxílio de um swab a bactéria patogênica foi espalhada em placas de Petri contendo meio de cultura SSDL agar.

Em seguida, foram realizadas perfurações no meio de 7 mm de diâmetro. Nesses poços foram adicionados o hidrogel contendo o microrganismo probiótico. As placas foram incubadas a 30 °C e a leitura foi realizada em 72 horas. O antagonismo foi observado pela formação de um halo de inibição formado no entorno do poço.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

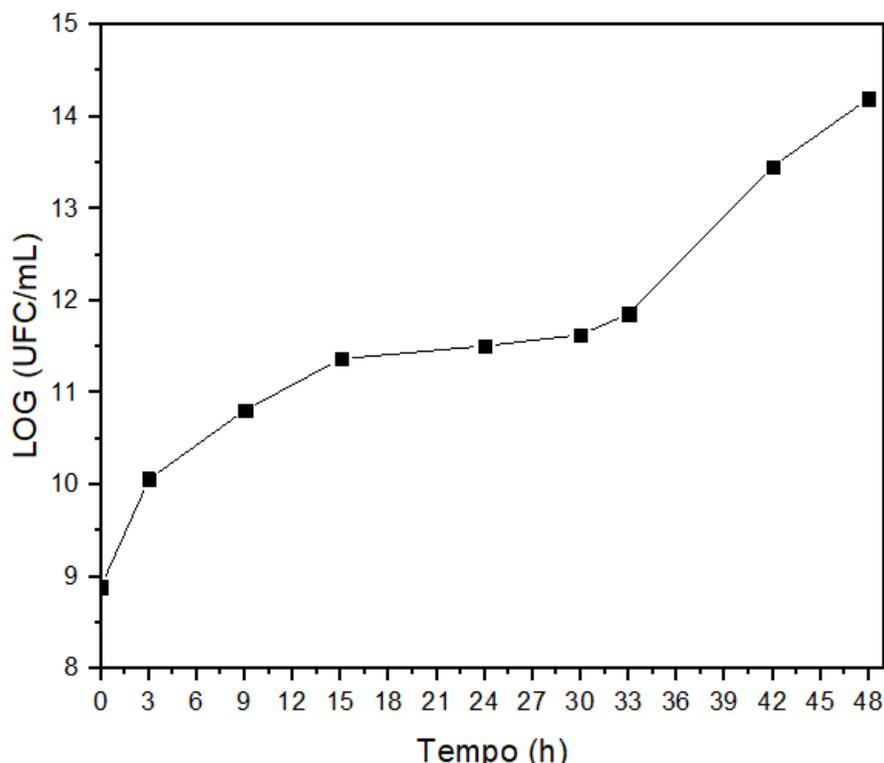
Os dados foram avaliados por meio dos parâmetros estatísticos (Pass) e análise de variância (ANOVA), e comparação de médias por Tukey ao nível de 5% de significância, com uso do software Origin for Windows 8.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Na avaliação da cinética de crescimento de *Zymomonas mobilis* foi possível observar o seu crescimento ao longo de 48 h (Figura 4) apresentando aumento exponencial até 15 horas após inoculação do microrganismo, atingindo 11,37 log UFC/mL em 15 horas. Mantendo-se em sua fase estacionária o log de 11 até o período de 33h com 11.86 log UFC/mL. Após o período de 33h o microrganismo volta a sua fase de crescimento chegando a um log de 14.20 UFC/mL em 48 horas.

Figura 4: Cinética de crescimento da cepa de *Zymomonas mobilis* AG-11 UFPEDA 198 log UFC/mL.



Fonte: Autor (2024).

Segundo Santana (2021), em sua análise de cinética de crescimento com *Zymomonas mobilis* Zap 205 apresentou crescimento exponencial em 6h após o inóculo até o período de 24h, com log UFC/mL de 7,6 a 8,1. Apresentando seu maior pico de crescimento em 24h com 8,1 log UFC/mL. Estando em sua fase estacionária de 24 a 42 horas mantendo o log UFC/mL de 8 e, posteriormente, apresentando sua fase de declínio. Em comparação com essas análises é possível observar resultados

promissores (Figura 4) visto que a cinética de crescimento apresentou 14 log UFC/mL em 48h.

A capacidade de *Zymomonas mobilis* de apresentar duas fases distintas de crescimento exponencial pode estar relacionado a sua capacidade de nutrir-se por meio da produção de metabólitos secundários. Esse fenômeno promove a otimização dos recursos presentes no meio, destacando uma melhor adaptabilidade a condições adversas (Yang *et al.*, 2009).

A taxa de crescimento bacteriano está relacionada à variação da multiplicação e crescimento de uma cultura de células, aumentando consequentemente o volume de biomassa ao longo do tempo. A fase lag corresponde à fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura no qual foram inseridos. Nesta fase, as células estão metabolicamente ativas, criando condições ideais para a divisão por meio da produção de enzimas e coenzimas. Na fase de crescimento ou exponencial, o número de células aumenta ao longo do tempo. Posteriormente, a fase estacionária, na qual o número de células viáveis mantém-se constante. Por último, tem-se a fase de declínio ou morte, onde as condições do meio se tornam inviáveis para a sobrevivência das células.(Da silva, 2024).

Para o processo de microencapsulação foi selecionado o tempo de crescimento de 24 h, com uma concentração de 11,11 log UFC/mL, visando uma celeridade na produção de um produto probiótico.

6.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.

Com os resultados obtidos (Tabela 2) é possível analisar que o microrganismo manteve-se ativo durante todo o processo de encapsulamento e apresentou uma eficiência de 102% , demonstrando um aumento de 0,30 log UFC/g em relação à concentração inicial.

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônias (Log UFC/g média \pm desvio padrão) antes e após o processo de encapsulação e eficiência de encapsulação (EE%).

Eficiência de encapsulação	Log UFC/g	EE%
<i>Zymomonas mobilis</i> (Zy)	11,11 \pm 0,04	-
Zy + Quitosana 2%(Zy+Qui2%)	11,41 \pm 0,11	102%

Fonte: Autor (2024).

Zoldan (2022) promoveu o encapsulamento de cepas potencialmente probióticas e obteve uma eficiência de 92 a 99% em suas formulações, atestando a capacidade da bactéria de passar pelo estresse de encapsulamento e não perder sua viabilidade destacando a técnica de encapsulamento como adequada para linhagem das cepas probióticas.

6.3 VIABILIDADE E ESTABILIDADE

A contagem das células viáveis ao longo de 60 dias é evidenciada na (Tabela 2), na qual é possível observar um aumento no número de células de 0,30 log UFC/mL em 0 dias. Em 60 dias, houve uma diminuição de 1,58 log UFC/mL para as células livres e para formulação de Zy+Qui2% houve uma queda de 3,26 Log UFC/mL. Entretanto, o número de células viáveis para desenvolvimento de um probiótico se mantém acima do determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 10^{-8} log UFC/mL.

Tabela 3 – Viabilidade e estabilidade em Log UFC/g de *Zymomonas mobilis* (livre) e microencapsulada armazenada em temperatura refrigerada (5 °C).

Viabilidade e estabilidade	<i>Zymomonas mobilis</i> (Livre)	Zy + Quitosana 2% (Zy+Qui2%)
0 Dias	11,11 ± 0,04	11,41 ± 0,11
10 Dias	10,84 ± 0,06	8,64 ± 0,04
20 Dias	9,52 ± 0,13	8,38 ± 0,21
30 Dias	10,51 ± 0,06	9,51 ± 0,07
60 Dias	9,58 ± 0,18	8,15 ± 0,22

Fonte: Autor (2024).

A utilização do polímero catiônico quitosana para aumentar a viabilidade e estabilidade de *Zymomonas mobilis* no decorrer do tempo, se destaca devido sua complexidade estrutural. A quitosana fornece uma proteção maior aos microrganismo se comparado com outros polímeros encapsulantes.

O trabalho de Trabelsi *et al.* (2013) relata a eficácia da quitosana em sua análise de viabilidade durante um período de 30 dias sob as mesmas condições de armazenamento, em que o pesquisador utiliza microrganismos encapsulados com alginato e adiciona a quitosana para melhorar a estabilidade de uma das amostras .

Os resultados demonstraram uma diminuição relativamente baixa de 99,35% para 96,14% do microrganismo encapsulado com a adição da quitosana e uma queda significativa utilizando apenas o polímero alginato de 97,43% para 47%. E relata que essa queda acentuada está relacionada a espessura e rigidez dos polímeros utilizados.

No decorrer do processo de encapsulamento, os microrganismos se mantêm viáveis durante um determinado tempo devido à proteção e capacidade de liberação controlada dos compostos bioativos por meio do polímero encapsulante. Além disso, microrganismos submetidos às mesmas condições em sua forma livre apresentam uma queda significativa no log UFC/mL, podendo até não apresentar crescimento bacteriano (Afzaal *et al.*, 2020; García *et al.*, 2021).

6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

6.4.1 TAMANHO DE PARTÍCULA (POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO)

O tamanho das partículas (\emptyset) na análise variam de 2,27 μm no tempo 0, mantendo a uniformidade de 2,34 μm em 30 dias de análise (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise da estabilidade da formulação de Hidrogel + probiótico quanto ao Tamanho da Partícula - \emptyset em (nm), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta - ζ em mV, após o preparo da formulação.

Tempo (dias)	\emptyset (μm)		PDI		ζ (mV)	
	AG11+Qui (2%)	QUI (2%)	AG11+Qui (2%)	QUI (2%)	AG11 + Qui (2%)	QUI (2%)
0 dias	2,27 \pm 0,01	0,67 \pm 0,00	0,466 \pm 0,04	0,489 \pm 0,00	46,6 \pm 0,7	19,46 \pm 0,6
10 dias	2,32 \pm 0,00	0,65 \pm 0,00	0,493 \pm 0,00	0,502 \pm 0,00	47,93 \pm 0,37	22,26 \pm 0,40
20 dias	2,31 \pm 0,00	0,65 \pm 0,00	0,421 \pm 0,01	0,218 \pm 0,00	65,8 \pm 0,45	34,33 \pm 2,15
30 dias	2,34 \pm 0,00	0,65 \pm 0,00	0,467 \pm 0,01	0,422 \pm 0,03	63,9 \pm 3,45	37,33 \pm 2,95

Fonte: Autor (2024).

Manikandan *et al.* (2015) relataram que a adição de TPP (tripolifosfato de sódio) à quitosana em pH 5,0 influencia a formação de nanopartículas com tamanhos controlados. Segundo os autores, ao alterar o pH, a formação das nanopartículas também varia. Portanto, em um pH adequado, é possível obter controle e uniformidade no tamanho das nanopartículas de quitosana. Apesar de

não ser realizado o controle de pH durante a síntese neste trabalho, o tamanho das partículas (\emptyset) na análise se mantiveram uniformes durante os 30 dias.

Os resultados observados na (Tabela 3) demonstram uma variação no PDI de 0,493 a 0,421 constatando que durante os 30 dias de análise as amostras se demonstraram monodispersa, ou seja, são aproximadamente do mesmo tamanho. O índice de polidispersão (PDI) é adimensional e sua escala diz que valores menores que 0.5 são sistemas extremamente monodispersos e maiores que 0.7 indicam que a amostra é polidispersa, ou seja, mais propensa a formar aglomerados (Danaei *et al.*, 2018).

Os dados obtidos na (Tabela 3) ζ (mV) demonstraram uma variação de 46,6 mV a 63,9 mV de 0 a 30 dias respectivamente, deixando claro a estabilidade das partículas. Segundo Laouini (2012), suspensões de partículas com potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são geralmente consideradas estáveis.

O potencial zeta (ζ mV) é uma medida da magnitude da repulsão eletrostática ou atração entre as partículas. Esse parâmetro está relacionado com a carga superficial das partículas e com a polidispersidade, influenciando diretamente na homogeneidade dos tamanhos das partículas (Lima., 2022). O intervalo permitido para a detecção do potencial zeta em amostras varia de 3,8 nm a 100 μ m de diâmetro.

De acordo com Campos *et al.* (2022), a presença de grupos amino na estrutura química da quitosana está associada aos valores positivos de ζ , conferindo-lhe um caráter catiônico.

6.4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

A análise de *Zymomonas mobilis* utilizando uma objetiva de 100X com imersão em óleo revelou que as células apresentaram coloração rosada (figura 5 e 6), característica de bactérias Gram-negativas. Esta coloração está relacionada à parede celular de peptidoglicano ser menos espessa em bactérias Gram-negativas, que perdem o complexo cristal violeta-iodo durante a descoloração e fixam a safranina.

As (figuras 5 e 6) mostraram que a estrutura das células estão preservadas, permitindo a identificação de características típicas da bactéria. Além disso, não foi

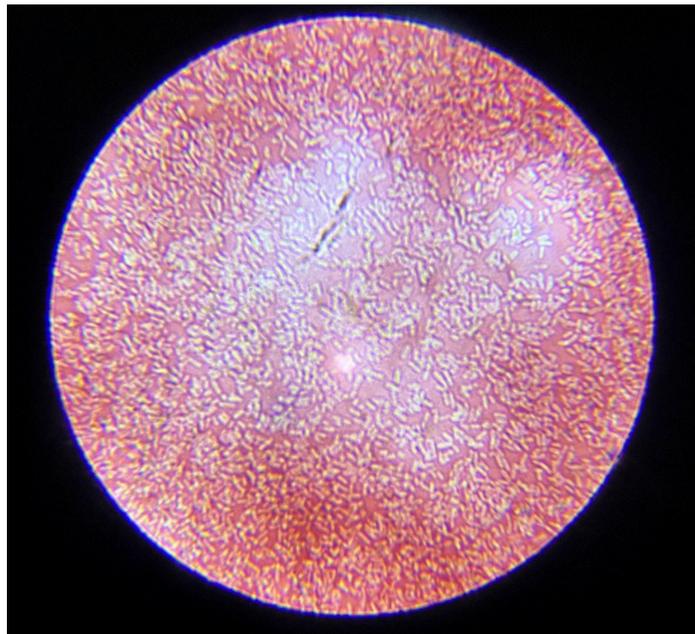
observada contaminação nas amostras, o que indica que o processo de preparação das culturas livres e encapsulados foi realizado adequadamente.

Figura 5 : Microscopia óptica *Zymomonas mobilis* livre



Fonte: Autor (2024).

Figura 6: Microscopia óptica *Zymomonas mobilis* encapsulado



Fonte: Autor (2024).

6.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PROBIÓTICO LIVRE E ENCAPSULADO

Na análise dos resultados foram observados halos de 11 mm até 18 para o microrganismo livre e de 12 até 28 mm para as células encapsuladas, nos testes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. *Z. mobilis* apresentou halos de inibição de 18 mm para células livres e 28 mm para encapsulada. Na Tabela 5 é possível observar melhor esses resultados e atestar que o processo de encapsulamento conferiu a bactéria uma melhor resposta ao microorganismo patogênico comparado com o microrganismo probiótico livre.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana (mm) *Z. mobilis* (Livre) e *Z. mobilis* + quitosana 2% frente a *S. aureus* isolados de mastite bovina (UFPEDA 1067B a 1076B) e UFPEDA 02.

Cepas <i>S. aureus</i>	Formulações (tamanhos de halos de inibição mm)		
	AG-11	AG-11 + Q2	Quitosana 2%
02 UFPEDA	18,50 ± 1,00	27,25 ± 0,50	24,00 ± 0,50
1067B	11,50 ± 0,58	20,50 ± 1,00	-
1068B	14,25 ± 0,50	25,25 ± 0,50	-
1069B	12,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	-
1070B	11,00 ± 0,00	16,00 ± 1,15	-
1071B	11,50 ± 0,58	13,25 ± 0,50	-
1072B	11,50 ± 0,58	16,25 ± 0,50	-
1073B	12,50 ± 0,58	12,50 ± 1,00	-
1074B	12,00 ± 0,58	12,00 ± 0,00	-
1075B	11,00 ± 0,00	15,25 ± 0,50	-
1076B	11,50 ± 0,58	15,00 ± 0,00	-

Fonte: Autor (2024).

Além disso, a quitosana de alto peso molecular (PM) confere atividades antimicrobianas extracelulares. No entanto, a quitosana utilizada para formulação encapsulante foi de baixo PM que possui atividade tanto extracelular quanto intracelular. Tratando-se de bactérias gram-positivas, como na *Staphylococcus aureus*, elas possuem uma parede celular de peptidoglicano mais espessa, que pode impedir a ligação direta da quitosana à membrana celular. Porém, alguns oligômeros de quitosana de baixo PM podem penetrar na parede celular e influenciar o DNA ou a síntese de proteínas (Raafat *et al.*, 2008; Ke *et al.*, 2021).

Segundo a literatura, as bactérias gram-positivas demonstram ser mais sensíveis à quitosana. Porém, a formulação de quitosana de baixo PM a 2%, utilizada como controle, não apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *S.aureus* isoladas de mastite bovina. Apenas houve atividade da quitosana 2% frente a cepa padrão *S.aureus* UFPEDA 02 que obteve halo de 24 mm.

Lima *et al.* (2011) testaram 6 cepas de *Z.mobilis* frente a *S.aureus* e obtiveram halos variando de 5 a 13 mm e sugeriram que a atividade inibitória pode estar relacionada à capacidade de *Z.mobilis* de produzir bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas apresentam uma atividade restrita às espécies mais próximas taxonomicamente. Entretanto, a literatura relata a capacidade de certas cepas de inibir organismos não relacionados. A maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias-alvo, sendo ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas, característica das bactérias teste *S.aureus* (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Contudo, Rutikis *et al.* (2022) analisou as características inibitórias de cepas de *Z.mobilis* através de análises de subprodutos ácidos e comprovaram que seus principais compostos antimicrobianos são acetato e propionato, considerando que a produção desses compostos estão diretamente relacionados com o catabolismo respiratório e realizado independentemente de crescimento celular, refutando a hipótese levantada por Lima *et al.*, (2011).

A ausência de atividade do controle de quitosana 2% (Tabela 5) pode estar relacionada à resistência das cepas isoladas de mastite bovina, considerando que obtiveram-se halos consideráveis quando testado com a cepa padrão UFPEDA 02. Entretanto, quando a *Z.mobilis* é incorporada no polímero encapsulante confere resultados promissores frente às cepas patogênicas. Esta atividade pode ter relação a ação sinérgica entre o microorganismo e o polímero encapsulante.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o encapsulamento de *Zymomonas mobilis* com o polímero de quitosana a 2% melhora significativamente a atividade antimicrobiana da bactéria probiótica frente a *Staphylococcus aureus*. Além disso, o encapsulamento demonstrou maior eficiência, viabilidade e estabilidade da bactéria ao longo do tempo. O processo de revestimento com quitosana mostrou-se homogêneo e estável em relação às partículas. Portanto, a microencapsulação apresenta um grande potencial para futuras aplicações, utilizando *Z. mobilis* como composto ativo. Para validar a eficácia do hidrogel probiótico, estão sendo conduzidas pesquisas *in vitro* e também *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

- ABIA. Números do Setor – Faturamento. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, 2020. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2019.pdf>. Acesso em: 16 maio. 2024.
- AFZAAL, M. *et al.* Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Science & Nutrition**, 17 fev. 2020. v. 8, n. 3, p. 1649–1656.
- AZARÊDO, G. A. De. Efeitos da ingestão de *Zymomonas mobilis* em ratos Wistar. **repositorio.ufpe.br**, 2004. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/8995>>. Acesso em: 31 jul. 2024.
- ANGELOPOULOU, A. *et al.* Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. **Critical Reviews in Microbiology**, 12 ago. 2019. v. 45, n. 5-6, p. 564–580.
- CARDOZO, L. Identificação dos fatores de risco associados à ocorrência de hiperqueratose na extremidade dos tetos em rebanhos leiteiros. **pesquisa.bvsalud.org**, 2017. p. 167–167. Acesso em: 27 mai. 2024.
- CARVALHO, K. De. Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 com dextrina de mandioca como agente encapsulante e aplicação na formulação de preparado sólido para refresco. **Utfpr.edu.br**, 2018.
- CILEITE - Centro de Inteligencia do Leite. www.cileite.com.br, out. 2020. Acesso em: 1 ago. 2024.
- CRISTINA, S. *et al.* EXTRATOS DE PLANTAS BRASILEIRAS NO CONTROLE DA BACTÉRIA *Staphylococcus aureus* CAUSADORA DA MASTITE CONTAGIOSA EM BOVINOS LEITEIROS. **Revista tecnológica**, 4 out. 2019. v. 27, n. 1, p. 48–58.
- CLOCK, D. C. *et al.* Diagnosis of clinical and subclinical mastitis in a rural property in Carambeí, State of Paraná. **Research, Society and Development**, 17 mar. 2021. v. 10, n. 3, p. e32310313411.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Monthly Analysis of Milk and Derivatives – October 2022. Companhia Nacional De Abastecimento, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-domerca-do/historico-mensal-de-leite>. Acesso em: 16 maio. 2024.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, dez. 2016. v. 61, p. 442–457.
- Chávarri, María, *et al.* “Microencapsulation of a Probiotic and Prebiotic in Alginate-Chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastro-Intestinal Conditions.” **International Journal of Food Microbiology**, vol. 142, no. 1-2, 15 Aug. 2010, pp. 185–189.
- Cobirka, Maros, *et al.* “Epidemiology and Classification of Mastitis.” **Animals**, vol. 10, no. 12, 26 Nov. 2020, p. 2212,.
- DANAEI, Marizieh *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **ResearchGate**, maio. 2018.
- DA SILVA REVIELLO, Juliana. Fundamentos da Microbiologia Veterinária. Freitas Bastos, 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Technical Circular. Milk production chain in Brazil: primary production. Embrapa Gado de Leite, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215880/1/CT-123.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2024.

FAO. FAO STAT – Pecuária Primária. Roma, Itália, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. 21 fev. 2024.

FERNANDES, C. Contagem de células somáticas (CCS) do leite: **Rehagro Blog**, 16 set. 2020. Disponível em: <https://rehagro.com.br/blog/contagem-de-celulas-somaticas-do-leite-definicao-importancia-e-como-reduzir/>. Acesso em: 1 ago. 2024.

FRANCO, A. B. *et al.* Mastite bovina e as suas consequências na saúde pública. **Pubvet**, out. 2022. v. 16, n. 10, p. 1–10. Acesso em: 21 fev. 2024.

GARCÍA, M. J. *et al.* Reevaluating a non-conventional procedure to microencapsulate beneficial lactobacilli: assessments on yield and bacterial viability under simulated technological and physiological conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 26 nov. 2021. v. 102, n. 7, p. 2981–2989.

GU, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. **Biotechnology and Bioengineering**, 12 maio. 2015. v. 112, n. 9, p. 1770–1782.

HARSHITHA V; VIVEK D; JAIPAL S. A Cutting-Edge Method for Regulated Drug Delivery - Microencapsulation. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, 5 ago. 2023. v. 15, n. 3, p. 203–210.

HOLKO, I. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. **Journal of Dairy Research**, nov. 2019. v. 86, n. 4, p. 436–439.

HUMAYUN, M. *et al.* Immunomodulatory Effects of Probiotics: A Novel Preventive Approach for the Control of Bovine Mastitis. **Microorganisms**, 14 nov. 2022. v. 10, n. 11, p. 2255–2255.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Agricultural Census. Definitive Results. Brasília/Rio de Janeiro: Ministry of Economy, 2019. Acesso em: 16 maio 2024.

Pecuária Leiteira: inovações e tecnologias na produção de leite. **Pastoextraordinario.com.br**, 2024. Disponível em: <https://www.pastoextraordinario.com.br/pecuaria-leiteira-inovacoes-e-tecnologias-na-producao-de-leite.html>. Acesso em: 1 ago. 2024.

Mapa do Leite. Ministério da Agricultura e Pecuária, 16 jul. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 1 ago. 2024.

NDAHETUYE, J. B. *et al.* Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. **Tropical Animal Health and Production**, 28 abr. 2019. v. 51, n. 7, p. 2037–2044.

SANTOS, J. De F. M. *et al.* The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 2004. v. 37, n. 6, p. 502–504.

SHARUN, K. *et al.* Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, 1 jan. 2021. v. 41, n. 1, p. 107–136.

LAOUINI, Abdallah *et al.* Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. **Journal of colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147-168, 2012.

LIU, Y. *et al.* Chitin extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells by successive two-step fermentation with *Lactobacillus rhamnoides* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, abr. 2020. v. 148, p. 424–433.

PAGANE, F. *et al.* **Zymomonas mobilis: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica** *Zymomonas mobilis: a promising microorganism for alcoholic fermentation*. [S.l.: s.n., s.d.].

SAHM, M. The genus *Zymomonas*. **The prokaryotes**, p. 2287-2301, 1992.

SREEKUMAR, Othumpangat; CHAND, Nagin; BASAPPA, Sidappa C. Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 3, p. 334-338, 1999.

SWINGS, J.; DE LEY, Jozef. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.

WATTIAUX, M. **Essenciais em Gado de Leite, SECREÇÃO DO LEITE NO ÚBERE DA VACA DE LEITE ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA**. 2020 [S.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4383/material/20_secre%C3%A7ao_do_leite.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2024.

WEIR, P. M. The ecology of *Zymomonas*: a review. **Folia microbiologica**, 23 jan. 2016. v. 61, n. 5, p. 385–392.

YANG, Shihui *et al.* Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. **Bmc Genomics**, v. 10, p. 1-16, 2009.

ZOLDAN, Jocelane *et al.* Avaliação da viabilidade e sobrevivência à passagem gastrointestinal simulada de cepas potencialmente probióticas, bioacessibilidade e análise de antioxidantes em chocolates. 2022.