



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISELLE APARECIDA NOBRE COSTA

**IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE
LACTOBACILLUS PLANTARUM EM ALIMENTOS E
HUMANOS COM USO DE FERRAMENTAS
MOLECULARES**

GISELLE APARECIDA NOBRE COSTA

**IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE
LACTOBACILLUS PLANTARUM EM ALIMENTOS E
HUMANOS COM USO DE FERRAMENTAS
MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.
Orientadora: Lucia Helena da Silva Miglioranza.

Londrina
2011

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C837i	<p>Costa, Giselle Aparecida Nobre. Identificação e monitoramento de <i>Lactobacillus plantarum</i> em alimentos e humanos com uso de ferramentas moleculares / Giselle Aparecida Nobre Costa. -Londrina, 2011. 151 f.: il.</p> <p>Orientadora: Lucia Helena da Silva Miglioranza. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011. Inclui bibliografia.</p> <p>1. <i>Lactobacillus plantarum</i> - Teses. 2. Leite - Análise - Teses. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico - Teses. 4. Probióticos - Teses. I. Miglioranza, Lucia Helena da Silva. II. Vilas-Bôas, Gislayne Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 664:637.1</p>
-------	---

GISELLE APARECIDA NOBRE COSTA

**IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM EM ALIMENTOS E HUMANOS COM USO DE
FERRAMENTAS MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Helena S. Miglioranza
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Raúl J. H. C. Gómez
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Sandra Garcia
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Elisabeth Neumann
UFMG – Belo Horizonte - MG

Prof. Dr. José Eduardo Garcia
UFPE – Recife - PE

Profa. Dra. Daniele Sartori
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
UNOPAR – Londrina - PR

Londrina, 04 de julho de 2011.



*"A resposta certa, não importa nada: o
essencial é que as perguntas estejam
certas."*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva de viver...

À minha mãe, pelo exemplo de vida, pela generosidade e por não me permitir esquecer que tem sempre Algo ou Alguém olhando por nós a nos mostrar que "CADA COISA À SEU TEMPO", é o melhor modo de vida;

Aos meus queridos e lindos irmãos, pelo carinho, incentivo e pela torcida organizada em tudo o que faço. Vocês sabem que são o meu refúgio;

Aos meus sobrinhos e sobrinha que são uma inspiração na missão de ser melhor a cada dia; Ao Fernando pelo apoio incondicional mesmo quando tudo parece errado, pelos conselhos sábios, pela inspiração no seu amor à ciência, e à formação de pessoas, pelos cortes no meu modo "*prolixo - perfeccionista*", pela doçura que encanta, enfim, por ser o meu porto seguro. Eu encontro a minha essência quando estou com você...

À professora Lucia pela orientação e amizade, pelo apoio e incentivo entusiasta às minhas idéias. Muitas vezes entrei na sua sala desanimada ou em pânico e você me encorajou a alçar vôos que nem eu mesma me dei conta de que seria capaz;

Ao casal Vilas-Bôas que foram mais que colaboradores, foram exemplos de dedicação à minha formação e a este projeto. Nós queríamos no CCB parceiros de trabalho, eu encontrei muito mais, tenho em vocês amigos muito queridos. Gislayne, talvez você não saiba, mas o seu "maravilhoso" já fez milagres nos meus dias;

À Dra. Francismar C. Marcelino, por aceitar este desafio conosco, por se mostrar uma profissional extraordinária. Encanta-me a sua experiência e humildade em passar o conhecimento à diante;

À Dra. Tiemi Matsuo por seu imenso "saber estatístico" dedicado a este trabalho;

Aos Drs. Raúl J. H. C. Gómez e Celso Duarte pelas valiosas contribuições no exame de qualificação;

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões. Os pontos de vista e contribuições de cada um certamente engrandecem o trabalho e colaboram particularmente com a minha formação;

Às minhas florzinhas Karlinha e Gix, irmãs que a vida se encarregou de presentear-me, pelas longas terapias, divagações, medos e sonhos compartilhados, por estenderem nossa amizade para além do Campus... Agente ainda vai onde os nossos sonhos nos levarem e iremos longe, eu sei;

Às queridas Fernanda Paião e Kérley Casaril pelas longas e proveitosas discussões no mini Lab de Biologia molecular, pelas experiências compartilhadas, e pelas boas risadas; Alguns vêm e vão, mas ficam de alguma maneira em nossos corações, com ou sem porquês, simplesmente porque a vida e sua imensidão de possibilidades os tornou especiais: Ana Paula Bilck, Graça Biachini, Dani D'oro, Michelle Rosset, Adriana Droval, Léo Raffa, Agnes, Fernanda Darpossolo, Talita Szlapak, Flávia Montanucci, Cássia, Joice, Rafael Dias, Lully, Lú Lobato, Carol Calliari, Marci, Cris Canan, Denis Marchi e Mariana Egea. Obrigado pelos bons momentos, pelos cafés e pelos churrascos. Que nós continuemos festejando a vida onde quer que ela nos leve...

À Mari Corso por sua disponibilidade e por ser esta meiguice de pessoa;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Bioinseticidas, e Laboratório de Biotecnologia Vegetal pela agradável convivência;

À turma do mestrado 2007, que me adotou como parte do grupo. Eu sinto saudades da nossa rotina no DCTA;

À Amanda Rosseto e Aloísio Henrique pela dedicação a este trabalho. Vocês foram fundamentais à minha formação. Eu espero que nossos desafios diários no laboratório possam no mínimo, ter despertado em vocês o lado instigante da pesquisa;

Às queridinhas do meu coração, Débora e Paula, que trouxeram mais intensidade aos nossos dias em Londrina. Saudades das nossas filosofias intermináveis...

Aos 62 voluntários, que se propuseram a ser nosso objeto de pesquisas e sem os quais certamente esse trabalho não aconteceria;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ pela concessão da bolsa e reserva técnica;

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, docentes e funcionários pela contribuição à minha formação, em especial às funcionárias Elza Youssef e à Sandra Rezende pela solicitude;

Às empresas, Christian Hansen, Danisco, Sacco e Duas Rodas pela doação de culturas e aromas;

Enfim, a todos que fizeram e fazem da vida acadêmica esta maravilhosa experiência profissional e humana.

MUITO OBRIGADA.

COSTA, Giselle Aparecida Nobre. **Identificação e monitoramento de *Lactobacillus plantarum* em alimentos e humanos com uso de ferramentas moleculares.** 2011. 151 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Bactérias ácido lácticas (BAL), sobretudo do gênero *Lactobacillus*, apresentam grande importância na indústria de alimentos por seu efeito benéfico sobre o hospedeiro. No entanto, o monitoramento destas bactérias em alimentos e no intestino humano é dificultado pela diversidade e por sua grande similaridade genética entre espécies. Neste trabalho, o gene *recA* de bactérias lácticas e entéricas foi analisado usando o método de *Neighbor-Joining*, com o objetivo de estabelecer relações filogenéticas entre estes microrganismos. A análise filogenética evidenciou agrupamentos distintos para BAL, enterobactérias e bifidobactérias. As bactérias pertencentes ao grupo do *Lactobacillus plantarum* foram claramente discriminadas entre si. Um par de iniciadores LPreCAF e LPreCAR com 23 e 18 pb foi selecionado e utilizado em reação em cadeia da polimerase (PCR). Isso permitiu detecção específica da espécie *L. plantarum*, tanto em meio de cultura, como em amostras de alimentos. O limite de detecção na PCR convencional foi de 1×10^3 UFC/mL para amostras de alimentos e 7×10 UFC/mL em meio de cultura. Visando a avaliação do *L. plantarum* no TGI humano, um leite fermentado contendo a espécie *L. plantarum* Lp115 foi formulado e utilizado em um estudo clínico com humanos. O produto se manteve química e microbiologicamente estável durante a estocagem sob refrigeração até 90 dias, com viabilidade na faixa de 9,39 a 8,66 Log_{10} UFC/mL, no início e final da estocagem. O produto foi caracterizado como leite fermentado adoçado e aromatizado e se manteve dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira vigente. O leite fermentado, foi inserido na dieta diária de 61 adultos saudáveis, visando avaliar a quantificação do microrganismo em amostras fecais durante variados períodos de consumo e pós consumo via PCR quantitativo em tempo real (qPCR), com uso de metodologia TaqMan® e análise de dados com base em quantificação relativa ACT. O DNA de uma espécie não comum no trato gastrointestinal (TGI) foi utilizado como DNA normalizador e o tempo zero, ou amostras não tratadas foram utilizadas como referência para efeito de quantificação relativa. O limite de detecção do método qPCR para o microrganismo alvo, foi de 1000 cópias do gene *recA*/reação e 8×10^1 UFC/reação para *L. plantarum*. Os indivíduos receberam dose diária de 2×10^{11} UFC/ dose de *L. plantarum*, que foi detectado e quantificado em todos os períodos de consumo na ordem de $10^3 - 10^4$ UFC/g fezes. Com relação ao tempo zero todos os períodos de consumo foram significativos ($P = 0,001$). Porém, 15 e 45 dias após interrupção da dieta, o lactobacilo não é detectado na microbiota fecal. O tempo de consumo não apresentou relação significativa com a ocorrência do *L. plantarum* nas fezes nas avaliações pós-consumo ($P = 0,09$). A análise dos dados tanto em quantidade de UFC como em N° de cópias do gene alvo apresentou alta correlação ($r = 1$, $p < 0,0001$). As metodologias empregadas foram sensíveis e eficientes, tanto para discriminação quanto para quantificação da bactéria alvo, e podem ser utilizadas para monitoramento da espécie em alimentos ou em ambiente de microbiota complexa, como o TGI humano.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Microbiota. Probióticos. Trato gastrointestinal. qPCR.

COSTA, Giselle Aparecida Nobre. **Identification and monitoring of *Lactobacillus plantarum* in foods and human with use of molecular approaches**. 2011. 151 f. Thesis (Doctoral Degree of Food Science) - University State of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB), particularly those belonging to the genus *Lactobacillus*, have great importance in the food industry for their beneficial effect on the host. However, monitoring of these bacteria in food and human gut is cumbersome due to the diversity and the high genetic similarity among species. In this study, the *recA* gene of lactic acid and enteric bacteria was analyzed using the *Neighbor-Joining* method with the aim of establishing phylogenetic relationships among these organisms. The phylogenetic analysis showed distinct clusters for LAB, enterobacteria and bifidobacteria. Furthermore, bacteria belonging to the *L. plantarum* group were clearly discriminated from each other. One set primer LPreCAF LprecAR, with 23 and 18 bp, was selected and used in conventional PCR. This allowed the specific detection of the *L. plantarum* specie, both in culture media and in food samples. The limit of detection in conventional PCR was 1×10 CFU / mL for food samples and 7×10 CFU / ml in culture medium. To assess *L. plantarum* in the human GIT, a fermented milk containing the species *L. plantarum* Lp115 was formulated and used in a clinical study. The fermented milk remained chemically and microbiologically stable during storage under refrigeration, within 90 days. The *L. plantarum* counting ranged from 9.39 to 8.66 Log_{10} CFU/mL at the beginning and at the end of the storage period, respectively. The product was characterized as fermented milk sweetened and flavored and remained within the parameters required by Brazilian legislation. The fermented milk, was inserted into the daily diet of 61 healthy adults to evaluate the quantification of microorganisms in fecal samples for varying periods of consumption and post consumption via real-time quantitative PCR (qPCR) using TaqMan® methodology and analysis data based on relative quantification ACT. The DNA of a species not common in the human gastrointestinal tract (GIT) was used as normalizing DNA. Moreover, the time zero or untreated samples were used as reference for the purpose of relative quantification. The detection limit to *L. plantarum* on the qPCR method was 1000 copies *recA* gene/ reaction and 8×10^1 CFU/reaction. The subjects received daily dose with 2×10^{11} CFU/dose of *L. plantarum*, which was detected and quantified in all periods of ingestion about $10^3 - 10^4$ CFU/g faeces. *L. plantarum* mean counts, from fecal microbiota obtained in each period of consumption, are significant as regarding time zero ($P=0.001$). Nevertheless, 15 and 45 days after the ingestion the lactobacilli is not detected in the fecal microbiota. The intake time also showed no significant ($P=0.09$) relationship with the occurrence of *L. plantarum* in the after consumption. The analyses between the methods of relative quantification in terms of CFU or number of gene copies showed high correlation ($r = 1$, $p < 0.0001$). The methods used were sensitive and efficient, both for discrimination and for target bacteria quantification and may be used for monitoring the species in foods or in complex microbial environment such as the human GIT.

Keywords: Lactic acid bacteria. Microbiota. Probiotic. Real time PCR.

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Capítulo 1

- Figura 1** – TGI humano e estimativa dos principais gêneros da microbiota, comuns em cada compartimento25
- Figura 2** – Número de espécies conhecidas utilizando investigação cultura independentes e cultura dependentes, ao longo de uma década de estudo.....47
- Esquema 1** – Diretrizes para caracterização de microrganismos probióticos para uso em alimentos.....30

Capítulo 2

- Figura 1** – Árvore filogenética construída a partir da comparação de 30 sequências do gene *recA* de BAL, bífido e enterobactérias, demonstrando as relações genéticas entre espécies relacionadas. O dendrograma foi construído pelo método de *Neighbor-Joining* e uso do algoritmo Clustal W. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando o coeficiente de Nei com valores de *bootstrap* baseados em 1000 repetições. Uma sequência de *B. Thuringiensis* foi incluída como *outgroup*. A barra de escala representa 10% de divergência na sequência de nucleotídeos77
- Figura 2** – Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 70 pb em um gel de agarose 2%, obtido a partir de iniciadores baseados no gene do 16S rRNA para linhagens de culturas de bactérias identificadas na Tabela 2, H₂O = Controle negativo M25 = Marcador com 25 pb78
- Figura 3** – Comparação das sequências parciais *consensus* do gene *recA* das 20 linhagens de *Lactobacillus*. Na região entre os nucleotídeos 412 e 519 estão localizados os iniciadores LPrecAF e LPrecAR. As regiões de pareamento dos

iniciadores estão sombreadas e os nucleotídeos diferenciáveis entre espécies estão em destaque.....	79
Figura 4 – Eletroforese do produto de PCR com 108 pb em gel de agarose 2%, obtido a partir de 19 linhagens de culturas de bactérias (A) , cuja identificação é apresentada na Tabela 2, e de amostras de alimentos (B) : S = Suplemento para ração animal, L = Leite fermentado com <i>L. plantarum</i> Lp115, K = Kefir, K + Lp = kefir adicionado de <i>L. plantarum</i> Lp115, I = logurte, MRS = Caldo MRS com <i>L. plantarum</i> , H ₂ O = Controle negativo, M100 = Marcador com 100 pb.....	81
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% com os limites de detecção da PCR obtido a partir de diluições seriadas (7×10^{10} UFC / ml a 7×10^1 UFC / mL) de uma cultura de <i>L. plantarum</i> Lp115 em caldo MRS, H ₂ O = Controle negativo, M100 = Marcador com 100 pb.....	82

Capítulo 3

Figura 1 – Leite fermentado pronto para consumo.....	97
Esquema 1 – Etapas de produção do leite fermentado.....	92

Capítulo 4

Figura 1 – Determinação das eficiências do sistema multiplex para o gene alvo (*recA*) e para o gene normalizador (*plcR*). As amostras do DNA genômico de *L. plantarum* **(A)** e *B. thuringiensis* **(C)** foram diluídas serialmente num intervalo de 10.000.000 a 100 cópias do gene/reação para obtenção de eficiências baseadas em N° de cópias do gene das bactérias ou, amostras de diluições das culturas cujas contagens em placa variaram de 8×10^1 a 80 UFC de *L. plantarum*/reação **(B)** e de 3×10^5 a 30 UFC/ de *B. thuringiensis*/reação **(D)**. Os

valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição, e eficiências calculadas com base na fórmula $E (\%) = [10^{(-1/\text{slope})}] \cdot 100$ 117

Figura 2 – Gráfico com valores médios da quantificação relativa ao tempo zero: **(A)** baseado em eficiências curva padrão com N° de cópias do gene *recA/g* fezes **(B)** baseado em curva padrão em UFC/g fezes nos períodos de consumo: 15, 30, 45, 60 e 90 dias seguido pelos seus respectivos pós consumos + 15 e +45 dias . A quantificação é dada em médias e relacionada ao tempo zero. *, Representam as médias com diferença significativa ($P < 0,005$) com relação ao tempo zero. #, Representam as médias com diferença significativa entre si. As barras representam desvio padrão121

Figura 3 – Correlações entre as quantidades de *L. plantarum*, obtidas por dados em N° de cópias do gene alvo/g fezes x UFC de *L. plantarum/g* fezes. **(A)** durante o período de consumo, **(B)** 15 dias após a interrupção do consumo e, **(C)** 45 dias após a interrupção do consumo de um leite fermentado contendo esta espécie124

Esquema 1 – Número de indivíduos teste e períodos de amostragem em dias109

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Agentes encapsulantes utilizados em microrganismos probióticos36

Tabela 2 – Alguns produtos probióticos ou fármacos regulamentados pela legislação brasileira, fabricante e microrganismos utilizados51

Capítulo 2

Tabela 1 – Linhagens bacterianas analisadas para estudo de conservação do gene *recA* e respectivos números de acesso no GenBank/NCBI69

Tabela 2 – Bactérias utilizadas para avaliação da especificidade da reação PCR.....70

Capítulo 3

Tabela 1 – Características do leite fermentado pronto para o consumo ao longo de 90 dias estocado a 10°C.....95

Capítulo 4

Tabela 1 – Médias geométricas da quantificação relativa ACT transformados em massa de amostra fecal (g) dos seis grupos de indivíduos, durante diferentes tempos de ingestão e após ingestão de *L. Plantarum*120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 JUSTIFICATIVAS	19
3 OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPITULO 1: MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E SAÚDE HUMANA	22
1 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1. PROBIÓTICOS E SAÚDE HUMANA	22
1.2. A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL	22
1.3. PROBIÓTICOS: HISTÓRICO E CONCEITOS	26
1.4. DIRETRIZES PARA CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	28
1.5. MECANISMOS DE AÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O HOSPEDEIRO	38
1.5.1. Capacidade de Adesão e Inibição de Patogênicos.....	38
1.5.2. Atuação em Desordens Intestinais	39
1.5.3. Efeito Sobre o Sistema Imunomodulador	41
1.5.4. Probióticos na Prevenção de Desordens Celulares.....	42
1.5.5. Efeito nas Doenças Cardiovasculares	44
1.6. ABORDAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	45
1.7. MERCADO E PERSPECTIVAS.....	48
2 REFERÊNCIAS	53

CAPITULO 2: ANÁLISE FILOGENÉTICA <i>IN SILICO</i> DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E NOVO PAR DE INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS	63
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ESTUDO FILOGENÉTICO.....	68
2.2. INICIADORES	68
2.3. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	70
2.4. AMOSTRAS DE ALIMENTOS	70
2.5. EXTRAÇÃO DNA.....	71
2.5.1. Extração de DNA a partir de Culturas Bacterianas.....	71
2.5.2. Extração de DNA a partir de Amostras de Alimentos.....	72
2.6. CONDIÇÕES DA PCR	72
2.7. ESPECIFICIDADE E DETECÇÃO DE <i>L. PLANTARUM</i>	73
2.8. LIMITE DE DETECÇÃO DO <i>L. PLANTARUM</i>	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS <i>RECA</i> DAS LINHAGENS EM ESTUDO	74
3.2. A ANÁLISE FILOGENÉTICA	74
3.3. SELEÇÃO DE INICIADORES	79
3.4. ESPECIFICIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO DA PCR	80
4. CONCLUSÕES	83
5. REFERÊNCIAS	84
CAPITULO 3: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEITE FERMENTADO COM <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> PARA USO EM ESTUDO CLÍNICO COM SERES HUMANOS.....	88

1. INTRODUÇÃO	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1. PREPARO DO INÓCULO	91
2.2. LEITE FERMENTADO	91
2.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	92
2.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	93
2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1. PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO	94
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO	94
4. CONCLUSÕES	98
5. REFERÊNCIAS	99
CAPITULO 4: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>L. PLANTARUM</i> POR PCR EM TEMPO REAL EM HUMANOS APÓS CONSUMO DIÁRIO DE LEITE FERMENTADO	103
1. INTRODUÇÃO	104
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1. RECRUTAMENTO E SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	108
2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	108
2.3. AMOSTRAS FECALIS	109
2.4. LINHAGENS REFERÊNCIA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	109
2.5. EXTRAÇÃO DE DNA DAS CULTURAS	110
2.6. EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS FECALIS	110
2.7. OLIGONUCLEOTÍDEOS	111
2.8. CURVAS DE CALIBRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA	111
2.9. CONDIÇÕES DE REAÇÃO PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	112

2.10. QUANTIFICAÇÃO DE DADOS - qPCR.....	113
2.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	113
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	115
3.1. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E SUJEITOS DA PESQUISA	115
3.2. ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	115
3.3. EFICIÊNCIA DO SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO qPCR	116
3.4. DETECÇÃO QUANTITATIVA DE <i>L. PLANTARUM</i> EM AMOSTRAS FECAIS	118
3.5. QUANTIFICAÇÃO COM BASE EM NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE ALVO OU CONTAGEM (UFC) DA BACTÉRIA ALVO	123
4. CONCLUSÃO.....	126
5. REFERÊNCIAS.....	127
CONCLUSÃO	133
ANEXOS.....	134
Anexo A – In Silico Phylogenetic Analysis of Lactic Acid Bactéria and New Primer Set for Identification of Lactobacillus Plantarum in Food Samples	135
Anexo B – Formulário de Cadastro de Projetos Vinculados aos Cursos de Pós-Graduação na UEL	143
Anexo C – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	151

1 INTRODUÇÃO GERAL

O trato gastrointestinal humano é composto por uma microbiota complexa e dinâmica, cuja composição difere ao longo dos órgãos, no lúmen e na mucosa, variando de acordo com a idade, estado de saúde e modo de vida.

Muitos estudos clínicos abordam a utilização de microrganismos probióticos e comprovam o efeito destes sobre o equilíbrio da microbiota intestinal, bem como os benefícios à saúde promovidos por estes microrganismos. Probióticos compreendem espécies, cuja caracterização é baseada na capacidade de resistir ao ambiente gastrointestinal, à resistência a microrganismos competidores, ao status GRAS (Generally Recognized As Safe), além de promoverem efeitos benéficos pela produção de biomoléculas e/ou pelo equilíbrio da microbiota intestinal. Historicamente bactérias lácticas, sobretudo do gênero *Lactobacillus*, e dentre as não lácticas, do gênero *Bifidobacterium* são as mais comumente utilizadas como probióticos.

O gênero *Lactobacillus* compreende espécies altamente relacionadas, tanto fisiológica quanto genotipicamente, sendo que a identificação deste grupo de bactérias, utilizando métodos fenotípicos convencionais é ambígua e em geral bastante complexa. Neste sentido técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso na discriminação destes microrganismos tanto em amostras de alimentos como em ambientes tal qual o trato gastrointestinal de humanos ou de animais.

Com o desenvolvimento da técnica de amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase - PCR desenvolvida em 1987, o cenário se tornou muito favorável a um maior entendimento da estrutura e da função do material genético. Com isso, a diferenciação genética de espécies, ou até mesmo de indivíduos, resultou em notáveis avanços na taxonomia de microrganismos, devido à sua sensibilidade e especificidade. Muitas técnicas baseadas no princípio de amplificação de DNA têm contribuído grandemente para a elucidação das interações entre microrganismos e seus hospedeiros. A compreensão destes fenômenos tem instigado pesquisas no mundo inteiro.

Uma das abordagens moleculares que permite a detecção e quantificação simultânea de um organismo, a PCR em tempo real ou qPCR

quantitativo, tem como fundamento os mesmos princípios de amplificação de fragmentos específicos do DNA ou RNA. Entretanto além dos reagentes envolvidos na reação convencional, há o envolvimento de moléculas fluorescentes que durante a amplificação emitem luz em comprimentos de onda específicos permitindo ao equipamento a captação e quantificação destas emissões. Atualmente as tecnologias são muito sensíveis e sofisticadas permitindo desde a simples detecção do alvo até a quantificação de células viáveis.

Neste cenário, o mercado de produtos lácteos, um dos principais veículos carreadores de bactérias probióticas, tem obtido altos índices de investimento baseados tanto no valor nutritivo e sabor agradável destes produtos como também pela sua capacidade de exercer efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor.

Alia-se aos aspectos positivos desta tendência, a utilização de ferramentas moleculares atualmente disponíveis e que permitem a discriminação de espécies microbianas muito relacionadas. A detecção e quantificação de microrganismos em alimentos, bem como seu monitoramento no intestino do hospedeiro permitindo avaliar seus efeitos, torna-se um desafio instigante.

Deste modo, a proposta do trabalho foi formular um produto lácteo contendo *Lactobacillus plantarum*, linhagem Lp115, identificar e quantificar a espécie no trato gastrointestinal por meio de análise da microbiota fecal de indivíduos saudáveis, durante e após a ingestão de dieta suplementada com esta linhagem por diferentes períodos de ingestão. Para esse monitoramento, desenhou-se previamente, iniciadores espécie- específico, que permitiram a discriminação desta espécie de outras espécies filogeneticamente relacionadas.

2 JUSTIFICATIVAS

O benefício clínico da terapia probiótica depende de muitos fatores, como a sua resistência ao trânsito no TGI, quantidade a ser ingerida, forma de ingestão e fatores relacionados ao hospedeiro, como a idade, dieta e estado de saúde. Além disso, a identificação precisa do microrganismo é necessária, pois o período necessário à implantação ou à promoção de efeitos benéficos por estes organismos é em geral espécie ou linhagem dependente.

O *L. plantarum* é um microrganismo caracterizado como probiótico em muitos países, e, no Brasil sua aplicação em alimentos ainda não é regulamentada com tal alegação. Não se tem registro do uso de *L. plantarum* incorporado industrialmente a alimentos ou fármacos no país, o que facilita o monitoramento da espécie bem como a avaliação dos seus efeitos em estudos clínicos. Além disso, não há relatos sobre o tempo necessário para que o *L. plantarum* linhagem Lp115 colonize o intestino humano e promova algum efeito benéfico.

Por outro lado, ao se investigar uma espécie no TGI, diante de grande número de espécies altamente relacionadas, torna-se fundamental o uso de ferramenta precisa, com elevada capacidade de discriminação.

Deste modo, o uso de técnicas moleculares para estudo de filogenia, identificação e quantificação de microrganismos via PCR convencional e quantitativa tornou-se interessante para estudos desta natureza, e foram empregadas no presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Discriminar *L. plantarum* de espécies filogeneticamente relacionadas comuns em alimentos e no trato gastrointestinal humano e avaliar o comportamento de *Lactobacillus plantarum*, linhagem Lp115, no trato gastrointestinal humano, por meio de monitoramento da microbiota fecal de indivíduos saudáveis, após ingestão de um produto lácteo fermentado com essa espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar as relações filogenéticas entre BAL e enterobactérias através do gene *recA*; S Desenhar iniciadores espécie específicos para *L. plantarum*;
- ✓ Estabelecer condições de PCR para discriminação de *L. plantarum* de espécies relacionadas;
- ✓ Elaborar um leite fermentado contendo a linhagem *L. plantarum* Lp115;
- ✓ Introduzir o produto na dieta de um grupo de voluntários por diferentes tempos de ingestão;
- ✓ Monitorar o microrganismo alvo por detecção e quantificação em fezes humanas por PCR em tempo real;
- ✓ Quantificar o *L. plantarum* em função do período de ingestão e verificar a ocorrência deste microrganismo na microbiota fecal após interrupção do consumo.

A tese será apresentada em quatro capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos de uma conclusão geral e Anexos:

1-Revisão de literatura: Microbiota intestinal, probióticos e saúde humana;

2-Artigo: Análise filogenética *in silico* de bactérias ácido lácticas e novo par de iniciadores para identificação de *Lactobacillus plantarum* em amostras de alimentos (DOI 10.1007/s00217-011-1508-7; Anexo A)

3-Artigo: Produção e caracterização de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*;

4-Artigo: Identificação e quantificação relativa de *L. plantarum* por PCR em tempo real em humanos após consumo diário de leite fermentado.

CAPÍTULO 1

MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E SAÚDE HUMANA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PROBIÓTICOS E SAÚDE HUMANA

O interesse pelo tema "Alimentos funcionais", está diretamente relacionado à crescente valorização da qualidade de vida e da prevenção de doenças. Evidências científicas oriundas de estudos mecanísticos e clínicos indicam que os benefícios à saúde promovidos por hábitos de vida saudáveis e pelo consumo de uma dieta balanceada e rica em ingredientes bioativos são abordagens cada vez mais atraentes às indústrias de fármacos e de alimentos, bem como à população de maneira geral.

Os alimentos funcionais são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que, além de fornecer a nutrição básica, promovam efeitos metabólicos e/ou fisiológicos, benéficos à saúde (WALKER, et al., 2006). Em geral, o termo se refere a um alimento que tenha sido modificado de forma a tornar-se funcional ou que naturalmente contenha compostos bioativos. Os alimentos funcionais são também conhecidos como nutracêuticos, alimentos medicinais, alimentos terapêuticos, super alimentos, "designer foods", "foodceuticals" e "medifoods" (SHAH, 2007).

Neste contexto, os microrganismos probióticos, que são capazes de promover efeitos benéficos num hospedeiro pela produção de compostos bioativos ou pelo equilíbrio da microbiota intestinal, são frequentemente associados a alimentos funcionais.

1.2 A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal humano (TGI) é constituído de diversos órgãos conectados, que estão envolvidos na conversão e fornecimento de nutrientes e fontes de energia a partir da absorção dos alimentos. Este complexo sistema tem uma arquitetura anatômica bem conhecida, com aproximadamente 7 m de

comprimento e uma superfície de aproximadamente 300 m² em adultos. A comunidade microbiana habitante destes órgãos é chamada coletivamente microbiota do TGI e é composta por uma miríade de células microbianas que superam as células do nosso corpo, por um fator de pelo menos 10, e tem uma grande diversidade de espécies cultiváveis, bem como aquelas que ainda não foram cultivadas ou identificadas. Compreender a dinâmica desta população é um desafio ao ecologista do TGI (ZOETENDAL, et al., 2008).

Antes do nascimento, os seres humanos se desenvolvem em um ambiente estéril, o útero. Entretanto, a ruptura de membranas por ocasião do nascimento expõe o recém nascido a uma grande diversidade de microrganismos, sobretudo aqueles que a partir de então colonizam o trato gastrointestinal (TGI) formando a sua microbiota. Ao longo do desenvolvimento humano, esta microbiota sofre variações de acordo com as fases da vida, com os hábitos e habitats aos quais cada indivíduo está exposto (ISOLAURI, et al., 2004; TIIHONEN, et al., 2010).

As mudanças mais dramáticas na composição da microbiota intestinal ocorrem na infância. Durante os primeiros dias de vida, a população de microrganismos é instável e tende a se estabilizar com a amamentação ou ingestão de substitutos do leite materno. A grande mudança nesta composição, no entanto, ocorre com a introdução de alimentos sólidos e com o desmame (FAVIER, et al., 2002). Ao longo da vida adulta, os microrganismos intestinais são relativamente estáveis, entretanto esta estabilidade é reduzida nos idosos (TIIHONEN, et al., 2010). Estas alterações podem ser atribuídas às restrições alimentares, às mudanças de hábitos, ao aumento da incidência de doenças e concomitante uso de medicação com o avanço da idade (GILL, et al., 2001; TIIHONEN, et al., 2010).

Os primeiros estudos com foco nas mudanças da microbiota intestinal humana, relatavam uma redução de microrganismos anaeróbios e bifidobactérias, bem como um aumento de enterobactérias em idosos (MITSUOKA, 1990). No entanto, estudos mais recentes sugerem uma redução da estabilidade e aumento da diversidade da microbiota intestinal com o avanço da idade (HOPKINS; MACFARLANE, 2002; MAUKONEN, et al., 2008; TIIHONEN, et al., 2010).

O TGI humano possui um ecossistema microbiano extremamente complexo baseado em competição e simbiose (MACKIE, et al., 1999). É constituído por pelo menos 400 a 500 diferentes espécies bacterianas, com número estimado

de 10^{14} células (OTT, et al., 2004; ZOETENDAL, et al., 2004; ZOETENDAL, et al., 2008).

A escassez de bactérias no TGI superior (esôfago, o estômago e o duodeno) parece ser devido à composição do meio (secreções: ácida, biliar e pancreática), que elimina a maioria dos microrganismos ingeridos, e à atividade motora propulsiva no final do íleo, que impede a colonização estável de bactérias no lúmen (GUARNER; MALANGELADA, 2003).

Em contrapartida, a porção inferior do TGI que compreende o baixo duodeno, intestino delgado e grosso, contem um ecossistema microbiano complexo e dinâmico com uma elevada densidade de bactérias vivas, atingindo concentrações de 10^{11} a 10^{12} células/g de conteúdo luminal, que corresponde a aproximadamente 1,5 kg de microrganismos (MOORE; HOLDEMAN, 1974; WHITMAN, et al., 1998; DEL PIANO, 2006).

A sucessão das bactérias intestinais é afetada por vários fatores. Essa população, cuja composição difere tanto ao longo do trato gastrointestinal como do lúmen para a mucosa (Fig. 1). A microbiota se desenvolve ao longo do tempo, determinado por uma interação entre fatores genéticos, o ambiente ou doenças a que o indivíduo está exposto, sua dieta, secreção de muco e enzimas digestivas, o peristaltismo intestinal. Como resultado, cada indivíduo tem uma microbiota característica única (ISOLAURI, et al., 2004; LEY, et al., 2006).

O ecossistema do TGI humano compreende membros de sete filos bacterianos: Firmicutes, bacterioidetes, actinobactérias, fusobactérias, cianobactéria, proteobactérias, e verrucomicrobia; sendo que firmicutes e bacterioidetes representam aproximadamente 98% desta população (LEY, et al., 2006) Neste ambiente, os membros permanentes, que colonizam e crescem no local em que são encontrados, são ditos microbiota autóctone, enquanto que os alóctones ou transientes são aqueles que são veiculados por alimentos, água e componentes ambientais e estão de passagem pelo local (LEY, et al., 2006; VENTURA, et al., 2010).

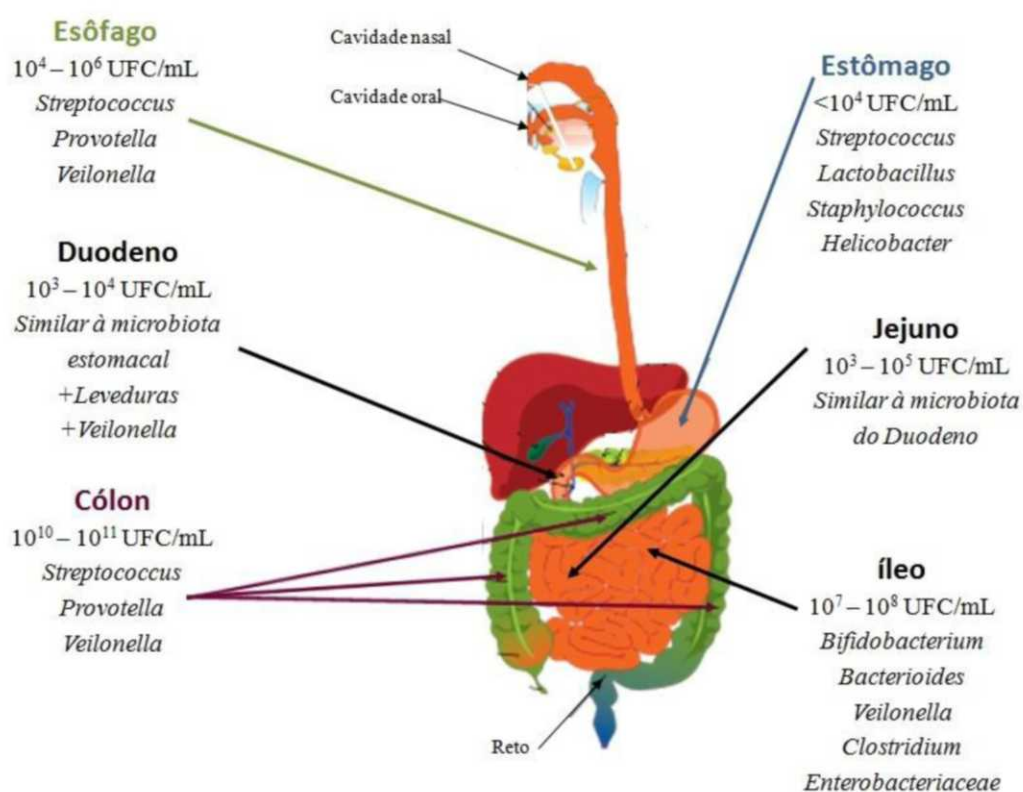
São muitos os estudos que abordam a importância da microbiota intestinal nas funções metabólicas, tróficas e de proteção no organismo do hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

O TGI exerce naturalmente a função de proteger o organismo contra patógenos e/ou metabólitos tóxicos. Esta proteção é assegurada por uma série de

fatores, incluindo a saliva, ácidos gástricos, peristaltismo, muco, proteólise intestinal, balanço da microbiota intestinal e as membranas epiteliais com os complexos juncionais intercelulares (OUWEHAND, et al., 2002a).

A mucosa intestinal forma uma interface entre o corpo e o ambiente luminal, cuja função é permitir a passagem de nutrientes, bem como atuar simultaneamente como barreira frente a microrganismos, toxinas e outras substâncias indesejáveis. Posteriormente, o muco produzido pelas células caliciformes, exerce esta função protetora, portanto, este efeito barreira é garantido pela integridade física, química e funcional do epitélio (CENCIC; LANGERHOLC, 2010).

Figura 1 – TGI humano e estimativa dos principais gêneros da microbiota, comuns em cada compartimento (Adaptado de: TIJHONEN, et al., 2010)



Há muito tempo o equilíbrio ou a disbiose desta microbiota vem adquirindo especial atenção por parte da comunidade científica, e muitas pesquisas indicam e comprovam o importante papel que o balanço adequado desta microbiota exerce sobre a homeostase de um organismo (JANKOVIC, et al., 2010). Alguns

microrganismos, em particular os probióticos, detêm maior importância na manutenção deste equilíbrio.

Para investigação da microbiota intestinal, a amostra mais facilmente disponível são as fezes, embora se questione o quão bem os microrganismos fecais representem a microbiota intestinal, uma vez que são oriundos do lúmen e do cólon sigmóide, e a composição da microbiota intestinal é diferenciada tanto neste segmento como ao longo de todo TGI e mucosa. É evidente que para informações mais precisas sobre a população microbiana do TGI, as amostras adequadas deveriam ser tomadas durante endoscopias ou processos cirúrgicos, o que torna o acesso bastante invasivo e, portanto, desaconselhado e pouco utilizado em pesquisas. Além disso, a falta de informações sobre os efeitos de anestésicos e produtos de assepsia utilizados nestes procedimentos podem comprometer a investigação (ISOLAURI, et al., 2004; LEY, et al., 2006). Deste modo, as abordagens de estudo da microbiota intestinal humana são em geral baseadas em modelos *in vitro* ou animal e na avaliação da microbiota fecal.

1.3 PROBIÓTICOS: HISTÓRICO E CONCEITOS

É bastante remoto o histórico dos efeitos benéficos que alguns microrganismos exercem sobre a saúde humana. Os relatos mais antigos são atribuídos, em particular, às bactérias do ácido láctico. Em uma versão persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), ocorre uma afirmação de que "Abraão deve sua longevidade ao consumo de leite ácido." Também em 76 A.C., o historiador romano Plínio recomendava a administração de produtos lácteos fermentados no tratamento de gastroenterites (BOTTAZZI, 1983; SCHREZENMEYER; de VRESE, 2001). Entretanto, os estudos envolvendo estes microrganismos e seus efeitos clínicos em animais e humanos são contemporâneos, e se baseiam na produção de substâncias benéficas e/ou promoção de um equilíbrio microbiano que favoreça o hospedeiro.

O conceito de microrganismo benéfico foi pioneiramente aplicado ao *Lactobacillus bulgaricus*, quando há mais de um século, ELIE METCHNIKOFF (1905), salientou a importância dos lactobacilos na microbiota intestinal, atribuindo-lhes a propriedade de manutenção da saúde e longevidade do hospedeiro. No entanto, o termo "probiótico", foi proposto décadas depois, por Lilly e Stillwell (1965), referindo-se a uma substância secretada por protozoários em simbiose. Parker

(1974) pioneiramente, utilizou o conceito, aliado à utilização de organismos ou substâncias que em oposição aos antibióticos, contribuem para o balanço da microbiota intestinal; mas o termo foi popularizado posteriormente, por Fuller (1989), quando então, definiu probiótico como suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, com efeitos benéficos ao hospedeiro por equilibrar a sua microbiota intestinal.

O termo probiótico vem sendo amplamente utilizado e, de acordo com os dados obtidos nas abordagens de pesquisas, o conceito geral sofre sutis alterações. Schrezenmeyer e de Vrese, (2001) definiram o termo como uma preparação de microrganismos ou um produto que contenha microrganismos viáveis em número suficiente para alterar, por colonização, a microbiota do hospedeiro, promovendo benefícios à saúde deste. Salminen e colaboradores, (2002), definiram probióticos como preparações de células microbianas ou componentes destas, viáveis ou inativas com efeitos favoráveis à saúde e bem estar do hospedeiro. Os benefícios devem ser avaliados em termo de mecanismos de ação e critérios de seleção devidamente estabelecidos e documentados.

Alguns autores estendem a ação dos probióticos também às células inativas, e argumentam que tanto células vivas ou mortas em produtos probióticos podem gerar respostas biológicas benéficas (HAVENAAR, et al., 1992; ADAMS, 2010). Esta abordagem abre novas perspectivas de pesquisas como, por exemplo, a quantidade de células necessária ou a proporção viáveis/não viáveis para obtenção do efeito desejado. Além disso, o uso de probióticos inativados, tem vantagens atraentes como a segurança do consumo e a perspectiva de produtos com longa vida de prateleira (ADAMS, 2010).

A FAO e WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization) mantêm o conceito geral definindo probióticos como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao seu hospedeiro (FAO/WHO, 2001). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005), segue a designação, e preconiza a ingestão de 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo, como quantidade mínima de bactérias viáveis para designação de um alimento probiótico.

Em Julho de 2008, a Anvisa alterou a lista de microrganismos probióticos utilizados comercialmente no Brasil, e atualmente, as bactérias

Lactobacillus acidophilus, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* possuem alegação de funcionais. Já nos demais países, os órgãos reguladores como FAO e WHO caracterizam como probióticos um número mais amplo de microrganismos (SAXELIN, et al., 2005; SHAH, 2007; SOCOL, et al., 2010).

A literatura científica reporta dados suficientes para demonstrar que os benefícios atribuídos a probióticos são inerentes a um aumento destes em um dado ambiente e a uma diminuição de bactérias potencialmente patogênicas (JANKOVIC, et al., 2010). Além disso, há mais de 20 anos, já havia sido demonstrado com a ingestão de probióticos que é possível alterar a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, em favor de espécies de lactobacilos e bifidobactérias. No entanto, ainda é complexa a associação desta mudança e seus efeitos benéficos em populações saudáveis (SAXELIN, et al., 1993; de VRESE, et al., 2006). Por outro lado, há consenso na associação de disbioses a doenças inflamatórias crônicas (MANICHANH, et al., 2006), obesidade (LEY, et al, 2006) e alergias (PENDERS, et al., 2006).

Em vista à popularidade dos alimentos probióticos e aumento substancial do número de artigos envolvendo estes microrganismos e seus efeitos, publicados em revistas científicas e pela imprensa leiga, a FAO e WHO (2001) estabeleceram comitês, cujas discussões geraram um documento com diretrizes que visam regulamentar a caracterização de microrganismos potencialmente probióticos, garantir a segurança do hospedeiro, observar os aspectos tecnológicos e comerciais de probióticos em alimentos, bem como a comprovação clínica dos efeitos esperados em indivíduos. (FAO/WHO, 2002).

1.4 DIRETRIZES PARA CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

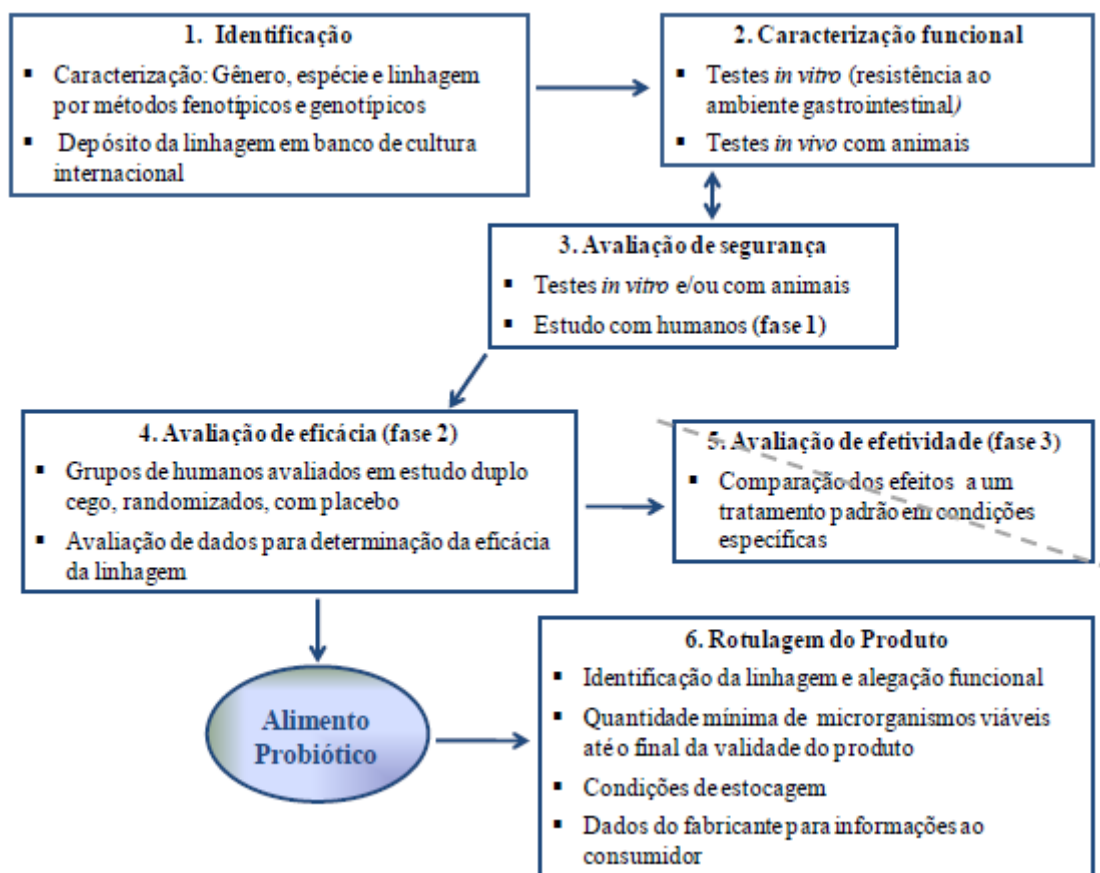
A avaliação da eficácia de probióticos requer a compreensão das características de cada linhagem individualmente, embora o uso de bactérias lácticas tenha um longo histórico de segurança. Os órgãos reguladores do controle sanitário em cada país recomendam a caracterização de quaisquer linhagens a serem utilizadas com alegação probiótica.

De acordo com as recomendações da FAO e WHO (2002) **Erro! Indicador não definido.**, o microrganismo potencialmente probiótico deve ser avaliado e deve apresentar algumas características fundamentais (Esquema1). Dentre essas características destacam-se a definição da origem e identificação, ser inócuo, apresentar resistência a ambientes inóspitos, e possuir atributos tecnológicos que propiciem sua viabilidade em quantidade suficiente para promover incrementos na saúde do hospedeiro (COLLINS, et al, 1998; HOLZAPFEL, et al, 2002; GUEIMONDE; SALMINEN, 2006; LACROIX; YILDIRIM, 2007).

A origem do microrganismo é importante e sua identificação precisa é uma exigência: um produto probiótico confiável exige a correta identificação da espécie bacteriana utilizada. Esta identificação pode se basear no uso de técnicas fenotípicas convencionais, aliadas a abordagem genética, o que permite uma classificação taxonômica precisa. A validação do método é importante, pois as investigações até o momento sugerem que muitos dos efeitos atribuídos ao probiótico são linhagem específicos, de forma que estudos com uma espécie ou linhagem não podem ser extrapolados para outras, mesmo aquelas estreitamente relacionadas (FAO/WHO, 2002; GUEIMONDE; SALMINEN, 2006).

Os microrganismos probióticos devem ser resistentes ao estresse ambiental, e ao ambiente gastrointestinal, além de possuir habilidades de crescimento *in vitro* e apresentar baixa taxa de ocorrência de mutações. A tolerância ao estresse fisiológico como baixo pH, elevada osmolaridade e bile, simulando ambientes extremos como no TGI é uma das características essenciais à probióticos, uma vez que podem assegurar a funcionalidade após a ingestão (LANKAPUTHRA, et al., 1995; BEGLEY, et al., 2006).

Esquema 1 – Diretrizes para caracterização de microrganismos probióticos para uso em alimentos (Adaptado de: FAO/WHO, 2002)



Até o momento, os estudos que avaliam a resistência de linhagens potencialmente probióticas aos sucos gástrico, pancreático e à bile, têm sido conduzido *in vitro*, e em geral utilizam suco gástrico artificial, bile suína ou bovina e extrato de pâncreas de vários animais (DEL PIANO, et al., 2006) No entanto, a falta de procedimento padrão para avaliação da tolerância ao TGI dificulta a comparação entre linhagens.

Em estudos envolvendo probióticos, DEL PIANO e colaboradores (2006 e 2008), investigaram a resistência de algumas linhagens de lactobacilos a secreções gastrointestinais artificiais e reais de origem humana, obtida em procedimentos clínicos, e observaram com relação ao suco gástrico que, menos de 20% das bactérias sobreviveu após uma hora da exposição ao suco gástrico simulado. Já o suco gástrico humano manteve uma taxa de sobrevivência entre 15% e 45%. Quanto à bile, foi demonstrado que as linhagens foram claramente mais sensíveis à bile bovina comparada a sais de bile humana. Com relação ao suco

pancreático, os autores verificaram que a sensibilidade varia em função do tempo de exposição e que não há diferença significativa entre o suco pancreático simulado e o humano. Deste modo, os autores propõem a utilização de secreções humanas na avaliação da resistência de probióticos ao TGI.

Embora alguns parâmetros usados com frequência na caracterização de probióticos, como a resistência a sais biliares *in vitro*, tenham correlação direta com a sobrevivência no TGI *in vivo* (CONWAY, et al., 1987), a positividade nestes testes não é suficiente para caracterizá-lo como probiótico e em geral testes *in vivo* são recomendados (FAO/WHO, 2002).

Probióticos devem ter *Status* GRAS (Generally Recognized as Safe). Ainda que a recomendação da FAO seja para avaliação de toda e qualquer linhagem com finalidade de uso probiótico, os dados necessários para avaliar a segurança destes microrganismos podem variar, dependendo da espécie de interesse, da intenção de aplicação e/ou da população alvo.

Historicamente, lactobacilos e bifidobactérias associados a alimentos têm sido considerado seguros (ADAMS; MARTEAU, 1995), entretanto, se não há histórico de uso seguro, são necessários estudos pré-clínicos extensivos, incluindo estudos de toxicidade conforme definido pelo Manual para ensaios com produtos químicos - OECD 408, (1998), além de estudos clínicos que demonstrem tolerabilidade da população alvo (JANKOVIC, et al, 2010).

A literatura reporta alguns casos de infecções sistêmicas relacionadas ao consumo de produtos probióticos comerciais (FAO/WHO, 2002). Embora todos eles sejam associados a pacientes em condições médicas subjacentes, há uma preocupação da comunidade científica no sentido de suprimir estas ocorrências. Além disso, há uma preocupação relacionada a linhagens de *Enterococcus* resistentes a vancomicina e outros microrganismos multi-resistentes às terapias antibióticas, uma vez que é possível transferir plasmídeos de resistência a outros microrganismos inócuos (COURVALIN, 2006). Microrganismos probióticos devem exibir tolerância a substâncias antimicrobianas utilizados na prática clínica, entretanto, não devem ser capazes de transmitir o fator de resistência a outros microrganismos (DEL PIANO, et al., 2006).

Em geral, os testes de segurança são aplicados em três fases que compreendem primeiramente a inocuidade do microrganismo, sobretudo no que concerne a infecções sistêmicas, atividades metabólicas deletérias, excessiva

estimulação do sistema imune em indivíduos suscetíveis. Em seguida, deve-se avaliar a sua eficácia. Essa deve ocorrer com base nos efeitos observados em grupos de indivíduos, comparados a um grupo controle, preferencialmente em grupos duplo cego randomizado com placebo, que visam a comprovação biológica e estatística dos efeitos inerentes àquele microrganismo utilizado. E por fim, a eficiência, que trata da comparação dos efeitos do probiótico com relação a um tratamento padrão sob uma condição específica, esta fase geralmente não é aplicada a alimentos probióticos (Item 5 do Esquema 1). Ainda em se tratando de probióticos em alimentos, nenhum efeito adverso deve ser apresentado mediante o consumo; na ocorrência de algum efeito colateral na fase de avaliação de segurança, deve ser relatado e monitorado (FAO/ WHO, 2002).

Estes microrganismos devem se manter viáveis durante e após o processamento, o transporte e estocagem no produto que os contém, além de manterem uma estabilidade que garanta o efeito benéfico quando consumidos.

A estabilidade de microrganismos probióticos varia de acordo com o gênero, espécie, linhagem e acima de tudo com o processamento e a formulação do produto no qual estão inseridos. Por consequência, esta estabilidade é dependente da etapa de seleção de linhagens tolerantes às condições do TGI, adaptação ao estresse (técnicas de cultivo, manipulação, preservação) e posteriormente às tecnologias de fermentação. A inclusão de micro-nutrientes, uso de embalagem com materiais impermeáveis ao oxigênio, a sonicação e a micro-encapsulação podem ser empregadas visando manter e/ou aumentar a viabilidade dos probióticos (SAKAR, 2010). Parâmetros como a atividade de água, temperatura, pH, pressão osmótica, concentração de oxigênio e estresse mecânico, também influenciam nesta estabilidade (DEL PIANO, 2006).

A resistência de BAL, sobretudo de algumas linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, a sais biliares e ácidos é um dos principais fatores para o uso destes microrganismos como probióticos. O efeito das condições gastrointestinais sobre a sobrevivência destes organismos revela diferentes níveis de tolerância em função da linhagem avaliada (HAVENAR, et al., 1992; LANKAPUTHRA; SHAH, 1995; JAYMANNE; ADAMS, 2006). Além disso, muitas linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. são incapazes de sobreviver em condições ácidas ou básicas (SHAH, 2000). Daí a importância na avaliação e seleção de potenciais probióticos.

A viabilidade e estabilidade de microrganismos probióticos são parâmetros chaves às alegações funcionais atribuídas a estes organismos e devem ser previstos, sobretudo nas etapas de seleção e processamento do probiótico, já que diversos fatores afetam esta condição até que o microrganismo alcance o local alvo no hospedeiro (LACROIX; YILDIRIM, 2007).

Uma alternativa à manutenção de células probióticas com alta viabilidade é a adição de substâncias cujo objetivo seja a proteção das células contra injúrias provocadas pelos processamentos. Estes compostos agem para incrementar a sobrevivência de probióticos durante o processamento e armazenamento dos alimentos, e adicionalmente, eles podem melhorar o processo digestivo (SAVINI, et al., 2010). As substâncias mais comumente empregadas são: leite, nitrogênio não protéico, hidrolisado protéico de soro de leite, L-cisteína, alguns prebióticos ou carboidratos simples (SaNKAR, 2010).

Dave e Shah (1998) observaram que a aplicação de cisteína, concentrado protéico do soro de leite, hidrolisado ácido de caseína ou triptona protegeu células de *B. longum* melhorando sua viabilidade. Os mesmos autores recomendaram também L- cisteína como fator de proteção em células de *L. acidophilus*. Também, Savini e colaboradores (2010) avaliaram vários agentes crioprotetores na viabilidade de *L. rhamnosus* IMC 501® e *L. paracasei* 502® liofilizados. Eles observaram que a glicerina estabilizou a viabilidade nas duas espécies e o manitol aumentou a viabilidade das bactérias, mesmo de células estocadas por cinco meses, à temperatura ambiente, quando comparado ao mesmo processo sem agentes protetores.

As interações entre microrganismos devem ser consideradas tanto na produção de alimentos como em quaisquer produtos onde ocorra mais de uma linhagem. Um exemplo de interação desfavorável ocorre com a presença de O₂ livre, que no metabolismo de algumas bactérias desencadeia a ativação do sistema lactoperoxidase. Este sistema é tido como um fator antimicrobiano natural do leite e para ativação, são necessários lactoperoxidase, H₂O₂ e tiocianato. Basicamente, o tiocianato é oxidado pela H₂O₂ numa reação catalisada pela peroxidase. São formados dois compostos: o ácido hipotiocianico e hipotiocianato, que atuam com antimicrobianos ativos (SARKAR; MISRA, 1994), o que pode inibir tanto espécies indesejadas como as espécies de interesse no meio. Embora seja desativado pelo

calor, o sistema lactoperoxidase pode ser reativado por algumas bactérias iniciadoras, pela produção de H_2O_2 .

Sarkar e Misra, (1994) relataram a inibição do crescimento das espécies do iogurte e de *L. acidophilus* durante a fabricação de um leite fermentado, devido à reativação do sistema lactoperoxidase pela produção de H_2O_2 por uma ou mais das espécies presentes. Do mesmo modo, observou-se inibição de *B. bifidum* e *B. longum* em presença de altas concentrações de O_2 e subsequente produção de H_2O_2 (KAWASAKI, et al., 2006). Adicionalmente, o H_2O_2 intracelular também pode bloquear a enzima frutose-6-fosfofrutocetolase responsável pelo metabolismo de açúcares em bifidobactérias (SAKAR, 2010). É possível controlar a produção de metabólitos como ácidos ou H_2O_2 , que influenciam o crescimento e viabilidade dos microrganismos num dado ambiente, para tanto, as interações entre linhagens ou a entrada de compostos que desencadeiem estes fenômenos devem ser muito bem controladas. A escolha adequada de embalagens e/ou a adição de agentes sequestrantes de oxigênio como o ácido ascórbico, podem ser fundamentais nestes processos (SAKAR, 2010).

Ainda, no contexto de interações microbianas, utiliza-se fermentação em dois estágios, visando obter maior viabilidade das culturas probióticas. Na produção de iogurtes probióticos, a primeira fase da fermentação envolve culturas probióticas durante 2h, seguido de fermentação normal, com as culturas tradicionais do iogurte (LANKAPUTHRA; SHAH, 1997).

Na incorporação de novas linhagens em qualquer produto, seu comportamento interativo com a cultura normal do produto ou entre as culturas contidas, devem ser avaliados, portanto, muitas vezes as linhagens são selecionadas com base em propriedades tecnológicas e não com base na promoção da saúde (LACROIX; YILDIRIM, 2007); embora a coexistência de ambas as propriedades seja sempre desejável e mais adequada.

Outro fator que afeta a viabilidade de microrganismos probióticos, está relacionado à adaptação das linhagens a condições estressantes no processo de obtenção de culturas. Estresse em doses subletais tem sido usado, no intuito de promover adaptação e melhorar a viabilidade. Alguns autores argumentam algumas linhagens de bifidobactérias submetidas a estresse subletal, tanto pelo aumento de temperaturas, quanto da concentração de sais; pode levar à síntese de proteínas protetoras específicas, resultando numa melhor adaptação ao meio e, por

conseqüência, levar a uma maior viabilidade (SCHIMIDT; ZINK, 2000; LACROIX; YILDIRIM, 2007). SAARELA e colaboradores (2004) também observaram que, na fase estacionária das culturas probióticas, os tratamentos subletais aumentam a sua viabilidade, tanto em escala de laboratório quanto em escala industrial. Os autores enfatizaram que o efeito foi mais acentuado em linhagens de *Lactobacillus* do que *Bifidobacterium*.

No entanto, alguns autores chamam a atenção para os efeitos destes tratamentos e alegam que adaptações a condições de estresse podem levar a redução na atividade celular, e eventualmente, a alterações na funcionalidade de células probióticas no intestino. É evidente que há necessidade de desenvolver uma compreensão mais aprofundada das respostas de probióticos a estas condições especiais (LACROIX; YILDIRIM, 2007).

O ambiente inóspito do trato gastrointestinal e as tecnologias empregadas para veiculação destes microrganismos são grandemente responsáveis por flutuações populacionais e baixa viabilidade de bactérias probióticas no organismo. É possível que a ingestão associada a alimentos proteja as bactérias durante a passagem pelo trato gastrointestinal ou que bactérias de origem humana tenham uma maior tolerância às secreções (FLOCH, 2002; DEL PIANO, 2006; RANADHEERA, et al., 2010).

Dentre as muitas abordagens aplicadas a microrganismos probióticos, com intuito de aumentar e manter a viabilidade, os processos de imobilização e microencapsulação vêm ganhando espaço na comunidade acadêmica e nas indústrias. Essas tecnologias podem se constituir ferramentas que melhoram a ação de compostos bioativos em alimentos, particularmente, podem manter a viabilidade de probióticos em ambientes inóspitos, uma vez que estes são protegidos pelos agentes encapsulantes (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

O método mais comumente utilizado envolve o preparo de cápsulas com uma solução de hidrocolóides onde são incorporados os microrganismos, com posterior extrusão. É um processo no qual as células vivas são empacotadas, impedindo a sua exposição direta ao ambiente desfavorável, mas que permite a difusão de nutrientes para dentro e para fora da matriz, aumentando assim a viabilidade das células (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2003).

Doleys e colaboradores (2002), observaram que as células imobilizadas de *B. longum* em grânulos de goma gelana aumentou em quatro vezes

a produção de células quando comparado à cultura de células livre. Sakar, (2010), bem como SOCOL e colaboradores (2010) fazem referência a estudos que abordam a microencapsulação como uma ferramenta adequada para proteger BAL probióticas contra o efeito do oxigênio, congelamento, condições ácidas, processamento e estocagem; além de proteger das condições inóspitas do TGI (Tabela 1).

Por conta de todos estes fatores, a produção de probióticos em escala industrial é um desafio tecnológico, tanto pela obtenção de um grande número de células viáveis, como pela manutenção desta viabilidade no produto pronto para consumo. Embora a quantidade de células requeridas para produzir benefícios terapêuticos não seja conhecida e possa variar em função da linhagem e do efeito de saúde desejados, em geral o nível mínimo de 10^6 bactérias probióticas viáveis/mL ou g do produto (alimento) tem sido recomendado (OUWEHAND; SALMINEN, 1998; ANVISA, 2008). No entanto, o período de ingestão necessário à obtenção de efeitos benéficos, é uma incógnita e parece variar em função do microrganismo utilizado e do hospedeiro.

Tabela 1 – Agentes encapsulantes utilizados em microrganismos probióticos

Microrganismos encapsulados	Materiais aplicados
<i>B. bifidum</i>	Carragena, alginato
<i>B. infantis</i>	Alginato, gelana, xantana, goma arábica, amido solúvel
<i>B. longum</i>	Carragena, alginato, goma locusta
<i>B. lactis</i>	Alginato, alginato de cálcio
<i>B. breve</i>	Proteínas do soro de leite, alginato + amido,
<i>B. pseudolongum</i>	Ftalato de celulose, polímeros de acetato
<i>L. lactis</i>	Alginato, gelatina, tolueno 2,4 diisocianato
<i>L. acidophilus</i>	Alginato, alginato de cálcio, alginato + amido
<i>L. plantarum</i>	Alginato
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	Alginato, óleo de sesame, lauril sulfato de sódio
<i>L. reuteri</i>	Alginato + amido
<i>L. rhamnosus</i>	Alginato

Adaptado de: SAKAR, (2010) e SOCOL, et al., (2010).

Por fim, probióticos devem apresentar propriedades funcionais benéficas ao hospedeiro (COLLINS, et al., 1998; HOLZAPFEL, et al., 2002).

Os probióticos podem fornecer muitos benefícios à saúde humana e animal, principalmente através da manutenção do equilíbrio e composição da microbiota intestinal. Muitos dados suportados por estudos clínicos evidenciam o uso de microrganismos probióticos na prevenção das doenças do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital.

Dentre os benefícios à saúde atribuídos a microrganismos probióticos, incluem-se: atividade antimicrobiana, redução do risco de doenças gastrointestinais, melhora no metabolismo da lactose, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas, efeito hipocolesterolêmico, propriedades anti-diarréicas, estimulação do sistema imunomodulador e melhora nas doenças inflamatórias intestinais (OUWEHAND; SALMINEN, 1998; GILL, et al., 2001; ISOLAURI, et al., 2004; SHAH, 2007; RANADHEERA, et al., 2010). Alguns dos benefícios de saúde estão bem estabelecidos, enquanto outros apresentam resultados promissores em estudos *in vitro* ou em modelos animais; necessitam portanto, de investigações mais aprofundadas.

O modo de ação para alguns dos efeitos inerentes a probióticos já estão bem fundamentados, o que habilita o microrganismo envolvido a ser utilizado de forma segura. Em geral os microrganismos cujas alegações são bem definidas, rapidamente são comercializados, adicionados a iogurtes, leites fermentados, queijos, sorvetes, sucos, cereais, associados ou não a compostos prebióticos para uso humano ou como complementos de ração para uso animal (GRANATO, et al., 2010; RIVERA-ESPINOZZA; NAVARRO, 2010; GAGGÍA, et al., 2010).

A recomendação da FAO/WHO para rotulagem de produto final, pronto para consumo, deve conter:

- ✓ A identidade do microrganismo, incluindo gênero, espécie e designação da linhagem. A denominação da linhagem não deve induzir o consumidor a erros sobre sua funcionalidade.

- ✓ A viabilidade mínima deve ser mantida até o final da vida de prateleira determinada àquele produto;

- ✓ As alegações de saúde referentes ao produto devem ser indicadas;

- ✓ Deve informar a quantidade mínima a ser consumida para promoção do efeito de saúde esperado,
- ✓ Discriminação das condições de estocagem
- ✓ Identificação e dados a respeito do fabricante, que permitam ao consumidor acessar outras informações que julgue adequadas.

1.5 MECANISMOS DE AÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O HOSPEDEIRO

Várias propriedades benéficas têm sido atribuídas aos microrganismos probióticos e a comprovação destes efeitos, com base em estudos *in vitro* e *in vivo* é uma premissa dos órgãos reguladores (OMS, FAO, ANVISA), tanto para caracterizar um microrganismo como probiótico, como para regularizar seu uso em alimentos ou fármacos.

1.5.1 Capacidade de Adesão e Inibição de Patógenos

Para atingir o epitélio e chegar aos receptores que permitirão a adesão e colonização, os microrganismos devem superar todas as etapas de passagem pelo TGI. Embora seja uma característica associada a espécies ou linhagens, algumas bactérias probióticas têm a habilidade de aderir às superfícies da mucosa intestinal. Esta característica é associada à promoção de efeitos imunomoduladores (OHASHI; USHIDA, 2009). Os mecanismos de adesão são complexos, e em geral associados à competição e a capacidade de comunicação destes microrganismos ("crosstalking" ou "quorum sensing") embora, muitos destes efeitos não sejam esclarecidos (OUWEHAND, et al., 2002b; MEDELLIN-PEÑA, et al., 2007).

Muitas linhagens probióticas podem aderir à camada mais externa do muco ou às partículas de alimentos formando um biofilme na sua superfície e impedindo a adesão de patógenos. A competição por espaço para adesão, que acontece entre as bactérias comensais e os patogênicos exógenos, resultam na exclusão competitiva no lúmen intestinal. Este conceito foi popularizado no início de 1970, quando se descobriu que a administração de microrganismos de origem intestinal de frangos adultos conferia resistência contra infecção por *Salmonella* a pintainhos (NURMI, et al., 1992).

A capacidade de aderir à mucosa intestinal, bloqueando os sítios de adesão nas células epiteliais é observada em cultivo de células e eventualmente em estudos *in vivo* utilizando modelos. WANG e colaboradores (2009) observaram adesão de *L. plantarum* e consequente aumento da resposta imune em células Caco-2 e IEC-6 em estudo *in vitro*. Posteriormente, utilizando camundongos, foram confirmados tanto a colonização do TGI, como a melhora do sistema imunomodulador *in vivo*.

Além disso, estas bactérias podem estabelecer uma relação simbiótica com o hospedeiro, criando um nicho de competição por nutrientes, onde a bactéria sinaliza o quanto precisa de um dado nutriente, o hospedeiro o produz e por sua vez este nutriente é completamente consumido. A produção e consumo total deste recurso impede a super produção do nutriente que favoreceria outros microrganismos concorrentes, isso cria nichos ecológicos que são associados à exclusão de patógenos exógenos (GUARNER; MALAGELADA 2003). Alguns autores associam a inibição da aderência de enteropatógenos à indução da expressão de genes de mucina intestinal (MACK, et al., 1999).

Finalmente, as bactérias comensais, sobretudo as probióticas, podem inibir o crescimento de seus concorrentes através da produção de substâncias antimicrobianas. A capacidade de sintetizar bacteriocinas é amplamente difundida na microbiota intestinal, e o organismo do hospedeiro pode controlar a produção de tais substâncias, uma vez que a maioria destes compostos são degradados por proteases digestivas, de forma que a ação é localizada (BERNET, et al., 1994; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Um dos efeitos benéficos da viabilidade de BAL no TGI é, possivelmente, devido à proliferação transitória destas bactérias *in vivo*, que representam uma barreira microbiana contra o desenvolvimento de bactérias patogênicas (HEYMAN; MÉNARD, 2002).

1.5.2 Atuação em Desordens Intestinais

A intolerância à lactose resulta da deficiência primária e secundária de lactase, e tem por consequência, dor e distensão abdominal, flatulência e diarreia. A ocorrência de diarreias é associada a um aumento da carga osmótica no

intestino delgado, com subsequente secreção de líquido nas fezes (SHERMAK, et al., 1995).

Probióticos são frequentemente relacionados à melhor absorção da lactose em indivíduos com deficiência de lactase. Os mecanismos propostos se devem à presença da enzima β -galactosidase, uma lactase bacteriana que auxiliam a clivagem da lactose antes que ela atinja o cólon, levando a posterior absorção sob a forma de monossacarídeos (DEWIT, et al., 1990).

As infecções do intestino como doença de Crohn, pouchites, colites e síndrome do intestino irritado, são geralmente caracterizadas por disfunções intestinais com irritações na mucosa, ocorrência de diarreia e, muitas vezes, vômitos. Em casos de gastroenterites associadas a patógenos e uso de antibióticos ou infecções por vírus, a ingestão de probióticos minimiza os efeitos e diminui o período de diarreias (GUARINO, et al., 1991). Em geral, o efeito é atribuído ao aumento de anticorpos, que promovem melhorias no sistema imunomodulador do hospedeiro (WALKER, 2008).

Em resposta a toxinas de *Clostridium difficile*, a ingestão de *Saccharomyces boulardii*, levou ao aumento dos anticorpos IgA e IgG. Do mesmo modo, indivíduos com gastroenterite rotaviral, tiveram aumento da produção de IgA após a ingestão de *L. rhamnosus* GG (WALKER, 2008)

Helicobacter pylori é uma bactéria que coloniza a mucosa gástrica, e sua presença é frequentemente associada a úlceras gástricas e ocorrência de câncer, embora seu papel na etiologia destas doenças não seja elucidado. O efeito de probióticos sobre *H. pylori* foi evidenciado em estudos *in vitro* e envolvendo modelos animais. Estes estudos comprovam que substâncias antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos produzidos por algumas linhagens de *Lactobacillus*, inibem o crescimento e adesão das células de *H. pylori*. Além disso, o efeito de probióticos sobre o sistema imunomodulador do hospedeiro reforça suas defesas contra este tipo de patógeno (KUMAR, et al., 2010).

A enterocolite necrosante é uma resposta inflamatória aguda, que afeta bebês prematuros. Acredita-se que a inflamação e necrose do intestino delgado ocorrem, devido a imaturidade da mucosa que, em contato com alguns microrganismos patogênicos, desencadeia uma resposta inflamatória (WALKER, 2008). Um estudo clínico envolvendo recém nascidos prematuros, demonstrou que a

introdução dos probióticos *Lactobacillus lactis* e *Bifidobacterium infantis* podem prevenir a expressão desta inflamação (DESHPANDE, et al, 2007).

Os probióticos, por seu efeito imunomodulador, também estão associados ao alívio de respostas inflamatórias em alergias de origem alimentar (KUMAR, 2010).

1.5.3 Efeito Sobre o Sistema Imunomodulador

Muitos estudos, indicam que a microbiota intestinal autóctone representa um importante modulador da homeostase intestinal. As interações desta microbiota com a mucosa epitelial e o tecido linfóide, estimulam o sistema imune no hospedeiro (SHI; WALKER, 2004).

Com a descoberta dos receptores toll-like (TLRs), uma classe de proteínas que atuam num papel chave no sistema imune, em células epiteliais, endoteliais e linfóide de eucariotos, foi proposto que estes receptores poderiam interagir com padrões moleculares de patógenos e bactérias comensais modificando a resposta inata e adquirida (AKIRA, et al., 2001). Os receptores TRLs interagem com lipopolissacarídeos na forma de complexos de proteínas após ancoragem na superfície celular por moléculas de superfície como o CD14. Com esta interação, uma série de moléculas de sinalização são ativadas na célula para a liberação do fator de transcrição nuclear (NFkB) que, por sua vez, transcreve citocinas inflamatórias, por exemplo, IL-8 e IL-6 que desencadeiam uma resposta inflamatória na presença de um patógeno invasor (WALKER, 2008).

O efeito das interações entre microrganismos e o TGI é observado em animais mantidos em ambientes isentos de contaminação e posteriormente colonizados com probióticos. Imediatamente após a exposição aos microrganismos do lúmen, o número de linfócitos intra-epiteliais aumenta muito. Os centros germinativos com células produtoras de imunoglobulinas surgem rapidamente nos folículos e na lâmina própria, e as concentrações de imunoglobulinas aumentam substancialmente no plasma (GUARNER; MALAGELADA, 2003). Esse efeito também é relacionado à capacidade de microrganismos probióticos interagirem com folículos linfóides intestinais (placas de Peyer), estimulando a resposta imune das mucosas por ação das células B, produtoras de IgA, e a migração de linfócitos ou

células T do intestino, um dos principais responsáveis pela imunidade celular (WALKER, et al., 2006).

Estudos demonstram que os probióticos também favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, por ação sistêmica devido a secreção de mediadores que estimulam o sistema imune (CROSS, 2002). Além disso, foi reportado que as células dendríticas podem estender seus apêndices entre e na superfície das células epiteliais. Esta interação leva à maturação das células dendríticas e à liberação de citocinas, que desencadeiam a conversão de células T helper, um componente importante na prevenção de doenças (WALKER, 2008).

MEDINA, et al., (2007) avaliaram a capacidade de diferentes linhagens de *B.longum* de induzir a produção de citocinas por células sanguíneas. Todas as linhagens induziram padrões de citocinas específicas, sugerindo envolvimento destas proteínas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento de respostas imunes.

Em estudos *in vivo* e *in vitro*, envolvendo a suplementação da dieta de camundogos saudáveis com *Lactobacillus rhamnosus* HN001e DR20, *L. acidophilus* HN017 e *B. lactis* HN019 e DR10, demonstraram que estes microrganismos foram capazes de aumentar vários índices da imunidade natural e adquirida (GILL, et al., 2000).

Em um estudo com crianças alérgicas a leite de vaca, em dieta suplementada com *L. rhamnosus* GG, foram detectados maior dosagem de imunoglobulina IgA e menor nível do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), em comparação com o grupo placebo (ISOLAURI, 1996).

A associação do consumo de probiótico a incrementos do sistema imunomodulador têm sido bem suportado por estudos clínicos, e há um consenso quanto ao equilíbrio da microbiota intestinal e estes efeitos. Em contrapartida, o desequilíbrio desta interação é diretamente correlacionada à ocorrência de doenças.

1.5.4 Probióticos na Prevenção de Desordens Celulares

O papel de microrganismos probióticos na prevenção de câncer de cólon ainda não é bem esclarecido. No entanto, o uso de probióticos foi relacionado à redução da atividade de enzimas fecais, conhecidas por produzir compostos

genotóxicos que atuam como iniciadores de tumores em seres humanos (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

O efeito da dieta no processo de carcinogênese pode ser mediado por mudanças na atividade metabólica e composição da microbiota do cólon (GUARNER; MALAGELADA, 2003). Existem evidências de que o microbiota intestinal normal pode influenciar a carcinogênese pela produção de enzimas que transformam pró-carcinogênicos em compostos ativos. Entre as enzimas encontra-se as P-glucuronidases, azoredutases e as nitroredutases (PICARD, et al., 2005).

As enzimas β - glucuronidases bacterianas no cólon são capazes de liberar substâncias cancerígenas derivadas da conjugação hepática com o ácido glicurônico e é um fator crítico na circulação entero-hepática de drogas e outros compostos externos. Azo e nitroredutases reduzem seus substratos a aminas, em geral mais tóxicas do que o composto de origem. Dentre estes produtos, a amônia que é considerada um potencial promotor de tumores no cólon. Outros produtos com possíveis efeitos adversos na mucosa intestinal são os ácidos biliares secundários (PICARD, et al., 2005).

Há também evidências de que microrganismos probióticos protejam o hospedeiro da atividade carcinogênica pela diminuição da produção e/ou atividade destes potenciais carcinogênicos (SAIKALI, et al., 2004; PICARD, et al., 2005). Os efeitos anticarcinogênicos podem ser atribuídos à inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Alguns microrganismos intestinais produzem no seu metabolismo, aminas heterocíclicas, que são associadas à mutagenicidade, estes compostos ocasionam danos severos ao DNA nas células do cólon do hospedeiro, no entanto, os microrganismos probióticos associados aos compostos prebióticos são capazes de absorver e desintoxicar tais compostos (WOLLOWSKI, et al., 2001).

Com relação às aminas heterocíclicas, em um estudo que investigou a eficácia de BAL contra 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolina, demonstrou-se que oito *Lactobacillus*, dentre 76 BAL avaliadas, apresentaram efeito antimutagênico (TAVAN, et al., 2002; PICARD, et al., 2005).

1.5.5 Efeito nas Doenças Cardiovasculares

Estudos demonstram que probióticos têm efeito benéfico sobre algumas desordens metabólicas como a hipertensão e hipercolesterolemia (LYE, et al., 2009). A síntese do colesterol ocorre principalmente no intestino. Desta maneira, a microbiota intestinal promove efeitos no metabolismo lipídico, diminuindo os níveis do colesterol sanguíneo e aumentando a resistência da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação, levando a uma redução da pressão arterial (GOEL, et al., 2006).

Experimentos com lactobacilos ou bifidobactérias evidenciam a diminuição dos níveis de colesterol sérico total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL), além do aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) (LIONG; SHAH, 2004).

Os mecanismos propostos para estes efeitos são associados a assimilação do colesterol durante o crescimento bacteriano ou a ligação do colesterol à superfície da parede celular destas bactérias (LIONG; SHAH, 2004). Além disso, há hipóteses relacionadas à capacidade de alguns microrganismos probióticos em produzir hidrolases que desconjugam ácidos biliares. Estes compostos quando desconjugados são reabsorvidos com menor eficiência quando comparados aos ácidos biliares conjugados, resultando em aumento da sua excreção nas fezes. Como o colesterol é precursor da síntese de ácidos biliares, à medida que aumenta a demanda para síntese destes ácidos que devem ser repostos, ocorre redução das concentrações plasmáticas de colesterol (BEGLEY, et al., 2006).

Os avanços recentes no estudo da microbiota intestinal têm identificado este ambiente como um dos fatores que modulam o metabolismo lipídico, daí a associação do equilíbrio microbiano intestinal na possível redução da obesidade (RASTMANESH, 2011).

A compreensão dos mecanismos de ação destes microrganismos tornará possível a seleção de linhagens que atendam as necessidades de cada hospedeiro. Essa necessidade é claramente indicada pelas diferenças na capacidade de aderência à mucosa, pela produção de muco nas diferentes faixas etárias e pela influência de doenças sobre a adesão de probióticos. O uso de

probióticos selecionados para grupos específicos de indivíduos, podem ser mais eficazes à saúde (OUWEHAND, et al., 2002).

1.6 ABORDAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

As técnicas tradicionais de cultivo microbiano, usadas para estudos da microbiota do TGI, são fundamentadas na análise de fenótipos com base na caracterização morfológica ou bioquímica. Estas técnicas são laboriosas, demoradas, sujeitas a interpretações equivocadas e permitem acessar apenas aproximadamente 40% desta microbiota (CAREY, et al., 2007). As razões para as deficiências do cultivo destes microrganismos por métodos tradicionais incluem desconhecimento do perfil nutricional do microrganismo, a seletividade do meio de cultura, o estresse imposto pelos procedimentos de cultivo, a necessidade de estringência das condições ambientais e dificuldades em simular as interações com o hospedeiro e com outros microrganismos (ZOETENDAL, et al., 2004).

Estudos envolvendo ácidos nucleicos indicaram que a maioria das bactérias em uma variedade de ecossistemas são diferentes daquelas descritas em avaliações por métodos dependentes de cultivo. Isto levou a um extenso desenvolvimento e aplicação de métodos independentes de meios de cultura para estudar ecossistemas microbianos complexos (ZOETENDAL, et al., 2004; ZOETENDAL, et al., 2008).

A reação da polimerase em cadeia (PCR), desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, possibilitou a produção, *in vitro*, de múltiplas cópias de sequências específicas de DNA, sem a necessidade de clonar estes segmentos (ALBERTS, et al., 1994). Variações desta técnica visam atender às necessidades e às evoluções da biotecnologia.

Adicionalmente, as BAL e bifidobactérias têm recebido muita atenção, especialmente a partir da criação do consórcio para sequenciamento do genoma destes microrganismos (Lactic Acid Bacteria Genome Consortium - LABGC) nos EUA, o que culminou no sequenciamento do genoma de linhagens industriais relevantes e muitos outros sequenciamentos estão em andamento. Atualmente, quatorze linhagens de *Lactobacillus* e dez de *Bifidobacterium* já foram sequenciadas pelo consórcio (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/>) ou por iniciativas privadas, sendo que, *B. longum* NCC2705 foi a primeira bifidobactéria a ter seu genoma

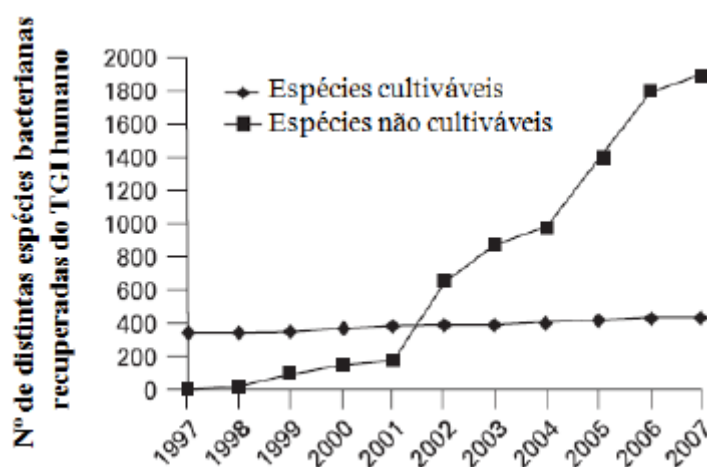
sequenciado em 2002, e *L. plantarum* WCSF1 em 2003, o primeiro lactobacilo (O'FLAHERTY, et al., 2009).

A facilidade de acesso a dados genômicos relacionados a microrganismos probióticos bem como as variedades de imunoenaios para estudos "*in vivo*" visando elucidar os efeitos fisiológicos de terapias probióticas, além de abordagens moleculares baseadas em PCR, ribotipagem, hibridização com sondas, têm aumentado significativamente o conhecimento da estrutura, diversidade e fatores que influenciam a dinâmica da comunidade microbiana do TGI, bem como os mecanismos pelos quais os probióticos podem influenciar a homeostase intestinal (VAUGH, et al., 2005; WALKER, et al., 2006; CAREY, et al., 2007).

Neste cenário favorável, marcadores moleculares na identificação de microrganismos probióticos vêm sendo empregados com sucesso e variadas técnicas evidenciam poderosas ferramentas que podem ser adequadas ao objeto de pesquisa e às condições laboratoriais. Atualmente, é empregado um grande número de técnicas moleculares que variam desde a identificação de *Lactobacillus* de diferentes ambientes (MOREIRA, et al., 2005), detecção de genes de patogenicidade em alimentos (BOTERO, et al., 2004), identificação e quantificação de bifidobactérias via PCR em tempo real (MASCO, et al, 2007), até estudos com abordagem proteômica, onde se avalia a expressão de genes de interesse ou as alterações ocorridas no hospedeiro em função dos efeitos de microrganismos (YUAN, et al., 2008; O'FLAHERTY, et al., 2010).

Além disso, estudos que empregam análise de sequências de genes para genotipagem de microrganismos, como abordagens envolvendo o rRNA da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA), estão permitindo expandir o conhecimento sobre a diversidade da microbiota do TGI. Somente uma década após a sua introdução, o número de espécies do TGI detectadas molecularmente ultrapassou em grande escala o número de espécies acessadas por métodos dependentes de cultivo (Figura 2) (ZOETENDAL, et al., 2008).

Figura 2 – Número de espécies conhecidas utilizando investigação cultura independente e cultura dependente, ao longo de uma década de estudos (Adaptado de: ZOETENDAL, et al., 2008)



Um das abordagens cada vez mais utilizadas são as técnicas de PCR em tempo real que identificam e quantificam organismos de interesse.

O uso da PCR em tempo real aliado à utilização de iniciadores específicos já provou ser um método preciso e adequado à identificação e quantificação de organismos (MATSUKI, et al., 2004). Esta ferramenta, sobretudo fornece novas perspectivas nos estudos da diversidade, abundância e dinâmica do ecossistema intestinal. (WALKER, et al, 2006; MASCO, et al., 2007, ZOETENDAL, et al., 2008). Deste modo a PCR quantitativa (qPCR) tem atraído à atenção como um método confiável e altamente sensível para detecção e quantificação de muitos organismos em diferentes ambientes. A técnica se baseia na tecnologia tradicional da PCR associada a compostos que emitem fluorescência em determinados comprimento de onda, o que torna possível monitorar a quantidade de produtos da PCR em cada ciclo de reação (WITTEWER, et al., 1997; VITALLI, et al., 2003).

Os métodos aplicados à qPCR são baseados na mensuração da fluorescência emitida em função do valor de CT, que é relacionado posteriormente à expressões matemáticas visando a quantificação absoluta ou relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). A adição de um gene normalizador adicionado à qPCR é altamente recomendada e tem a finalidade de corrigir possíveis diferenças de concentrações de DNA ou deficiências na extração. A normalização garante que flutuações na intensidade do sinal devido a impurezas no DNA ou quantidades de alvo abaixo do limite de detecção, sejam consideradas durante a análise. Todavia, a uniformidade deste gene durante todo o processo ou a

estabilidade da sua expressão durante o tratamento experimental, devem ser confirmadas (KUBISTA, et al., 2006; MARCELINO, 2009; HOFSTÄTTER, et al., 2010; DAN; SUN 2011).

Com o desenvolvimento dessas metodologias, algumas alternativas surgem para apurar ainda mais a técnica. Assim, a aplicação da qPCR para quantificar apenas as células viáveis (vqPCR) veio para por fim a uma das críticas comuns na quantificação de microrganismos probióticos, uma vez que a qPCR não distingue a viabilidade nas células microbianas.

A abordagem vqPCR baseia-se na distinção de células viáveis ou não viáveis pela integridade da membrana. Teoricamente, os corantes seletivos que penetram somente membranas de células permeáveis, mortas, ou o DNA extracelular, intercalam o DNA destas células indisponibilizando-as para amplificação nas reações de PCR. A presença de um grupo azida, presente em substâncias como monoazida de etídio (EMA) ou monoazida de propídio (PMA), permite ligações cruzadas entre o corante e o DNA após a exposição à alta intensidade de luz visível. A fotólise destas substâncias EMA e PMA converte o grupo azida em radicais nitrenos altamente reativos, que podem reagir com qualquer molécula orgânica na sua proximidade, incluindo o DNA, que neste estado não pode ser amplificado pela PCR (VARMA, et al., 2007; FITIPALDI, et al., 2010).

Inquestionavelmente, o uso de ferramentas genéticas acelerou o conhecimento e a compreensão das complexidades da microbiota intestinal e suas interações. Não só se começa a compreender melhor o papel destes organismos, como se permite a análise exata da funcionalidade do probiótico pela capacidade de obtenção de linhagens desprovidas de uma ou mais proteínas (O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010).

A aplicação destas tecnologias, sob o ponto de vista da genômica funcional, fornece um grande número de informações e impulsionam as pesquisas na busca da compreensão ampla de respostas aos fenômenos envolvendo microrganismos probióticos e seus efeitos.

1.7 MERCADO E PERSPECTIVAS

O interesse pelos alimentos funcionais está diretamente relacionado à crescente valorização da qualidade de vida e da prevenção de doenças, uma vez

que afetam funções específicas ou sistemas do corpo humano, além de exercerem sua função nutricional básica (SHAH, 2007). A indústria de alimentos tem desenvolvido uma variedade de novos produtos, cujos ingredientes contêm princípios ativos que podem ser revertidos em efeitos benéficos à saúde do consumidor.

O mercado mundial de alimentos funcionais gerou US\$ 32,07 bilhões em 2000, em 2005 este total foi de US\$ 68,39 bilhões, ultrapassou os US\$ 150 bilhões em 2010 e continua em expansão (GRANATO, et al., 2010). A América latina é considerada um mercado emergente e, apesar da falta de conhecimentos sobre nutrição da população em geral, mercados como Brasil e México, são potenciais mercados consumidores de probióticos (GRANATO, et al., 2010). O mercado de probióticos na América Latina expandiu 32% por ano entre 2005 e 2007 (CROWLEY, 2008) e estima-se que a taxa de crescimento anual de vendas de bebidas probióticas e iogurtes seja de 5% entre 2006 e 2011 (ÒZER; KIRMACI, 2010).

Entre os alimentos funcionais, os produtos lácteos com alegação funcional foram responsáveis por quase 43% do mercado mundial entre 2005 e 2010 (ÒZER; KIRMACI, 2010). Neste cenário, o emprego de microrganismos probióticos em alimentos ou fármacos promoveu um crescimento do mercado mundial, cujo faturamento atingiu US\$ 15 bilhões em 2007 com perspectiva superior a US\$ 19,0 bilhões em 2013 (AGHEYISI, 2008).

No Brasil as vendas de alimentos com alegação de funcionais atingiram US\$ 500 mil em 2007, correspondendo a 1% do total de gastos com alimentos (CRUZ, et al, 2007; GRANATO, et al., 2010). Segundo dados da Consultoria Euromonitor International, divulgados em 2010, em cinco anos o mercado de produtos destinados ao equilíbrio da microbiota intestinal teve um crescimento de 60% no Brasil, passando de R\$ 57 milhões, em 2004, para R\$ 92 milhões, em 2009 (REVISTA FATOR, 2011).

No âmbito científico, desde o início de 1990, um número substancial de estudos têm apoiado a idéia de que a saúde pode ser afetada pelo consumo diário de alimentos probióticos (HEYMAN; MÉNARD, 2002). Ao longo deste período as evidências passaram a estudos clínicos e atualmente existem muitas comprovações efetivas do efeito destes organismos no hospedeiro. A exploração destes dados permite a compreensão dos mecanismos pelos quais microrganismos

probióticos sobrevivem à passagem através do TGI para interagir com a microbiota residente, e afetar funções fisiológicas no hospedeiro. Entretanto, ainda há um vasto campo a ser investigado tanto no que diz respeito a classificação de uma linhagem como probiótica, quanto à tecnologias de produção e regulamentações destes produtos.

Para avaliar o impacto das pesquisas científicas na divulgação e consolidação dos benefícios de probióticos na dieta humana ou animal, foi realizada uma busca em três das principais bases de dados científicos disponíveis (Isi Web of Knowledge, Pub Med e Scopus). A busca foi restrita a dois períodos distintos e foi utilizado como parâmetro de seleção, a palavra chave "probiotic" no título da publicação. Houveram em média 410 publicações entre 1991 a 2001; já no período de 2001 a 2011, ocorrem em média 2406 registros. Analisando a base de dados Isi Web of Knowledge, em um período de dez anos, das 2686 ocorrências, 791 documentos tratam-se de patentes, 100 registros são referentes a revisões e todas as demais publicações tratam de artigos científicos disponibilizados completos ou parcialmente pela base de dados.

É evidente a importância das pesquisas científicas para um mercado onde o desenvolvimento de produtos deve atender aos anseios do consumidor final, sem deixar de lado o aspecto tecnológico e logístico, além das regulamentações de cada país. O mercado cresce à medida que o consumidor se sente atraído pelo produto ofertado, em contrapartida a credibilidade deste consumidor é baseada na observação dos efeitos, suportada evidentemente pelos estudos científicos e pelo "know-how" do fabricante.

A maioria dos produtos probióticos no mercado é adicionada de espécies de *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*, mas leveduras também são utilizadas, além de *Enterococcus* e *Bacillus*, estes dois últimos comumente direcionados a animais (SHAH, 2007; GAGGÍA, et al.; 2010). Na tabela 2, estão citados alguns microrganismos utilizados como probióticos para uso humano em produtos farmacêuticos ou em alimentos no Brasil.

Em 2005, SAXELIN e colaboradores vislumbravam muitas inovações tanto na condução de estudos como no mercado de microrganismos funcionais. Muitas destas estão sendo aplicadas e há perspectivas de muitas outras abordagens, porque este ramo da ciência é por si só desafiador.

Tabela 2 – Alguns produtos probióticos ou fármacos regulamentados pela legislação brasileira, fabricante e microrganismos utilizados

Categoria	Produto	Fabricante	Probiótico
Cápsulas	Floratil	Merck	<i>S. boulardii</i>
Sachet	FiberMais Flora	Nestlé	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Leite fermentado	Activia	Danone	<i>B. animalis</i> DN173010
	Actimel	Danone	<i>L. casei</i> <i>defensis</i>
	Batavito	Batavo	<i>L. casei</i>
	Bob Esponja	Batavo	<i>L. casei</i>
	Chamyto	Nestlé	<i>L. jonhsonii</i> / <i>L. helveticus</i>
	Danito	Danone	<i>L. casei</i>
	Leite fermentado	Paulista	<i>L. casei</i>
	Leite fermentado	Parmalat	<i>L. acidophilus</i> / <i>L. casei</i> / <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
	Sofyl	Yakult	<i>L. casei</i> <i>shirota</i>
	Vigor club	Vigor	<i>L. acidophilus</i> / <i>L. casei</i>
Yakult	Yakult	<i>L. casei</i> <i>shirota</i>	
Bebida láctea	Activia	Danone	<i>B. animalis</i> DN173010
	Biofibras	Batavo	<i>B. animalis</i> / <i>L. acidophilus</i>
	Lective	Vigor	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
	Nesvita	Nestlé	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
Queijo	Equilibra	Danubio	<i>B. animalis</i>
	SanBIOS	Coop. Santa Clara	<i>B. lactis</i>

Quais fatores serão predominantes no desenvolvimento de probióticos? Do ponto de vista mercadológico é um campo aberto em plena expansão, e os números evidenciam este cenário. Do ponto de vista científico, muitas pesquisas visam a seleção de culturas eficientes e com características desejáveis, e estão em evidência tanto o estudo de novos efeitos, como a elucidação de mecanismos de ação no nível molecular. A aplicação de técnicas de genômica funcional das bactérias probióticas, certamente vai acelerar o desenvolvimento de tais produtos (de VOS, et al., 2004).

Além disso, os avanços da era "ômica" serão cada vez mais utilizados para responder questões relacionadas às interações entre organismos. A biologia molecular e suas ferramentas, o acesso às bases de dados moleculares, a agilidade com que as informações são divulgadas são essenciais à identificação precisa destes fenômenos.

É importante que os resultados de pesquisas sejam modelos viáveis às tecnologias de produção, que as grandes corporações desenvolvam produtos que cumpram as exigências nutricionais e fisiológicas almejadas pela população alvo. Este "feedback" mantém a ciência e o mercado em constante evolução.

Diante de tais perspectivas, este trabalho utilizou ferramentas moleculares e de bioinformática para um estudo filogenético entre BAL e bactérias entéricas, propôs um novo par de iniciadores espécie-específico e estabeleceu condições de PCR para discriminar linhagens de *L. plantarum* de espécies filogeneticamente relacionadas em meio de cultura e em alimentos utilizando a PCR convencional. Posteriormente avaliou a quantidade deste microrganismo via PCR em tempo real (qPCR) na microbiota fecal de indivíduos adultos durante e após ingestão em diferentes períodos de consumo, de um leite fermentado produzido com *L. plantarum*, visando relacionar a quantidade do microrganismo com o tempo de consumo bem como a sua manutenção na microbiota fecal após a interrupção da ingestão.

2 REFERÊNCIAS

ADAMS, C. A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, 23 (1): 37-46.

ADAMS, M. R. and MARTEAU, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 27: 263-264.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005, atualizada em Julho de 2008. Legislação para alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 dez. 2010.

AGHEYISI, R. (2008). The probiotics market: Ingredients, supplements, foods - FOD035B. Food Beverage, June 2008. Available from: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2: 675-80.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3.ed. New York : Garland Publishing; 1294p.

BEGLEY, M.; HILL, C. and GAHAN, C. G. M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3): 1729-1738.

BERNET, M. F.; BRASSART, D.; NEESER, J. R. and SERVIN, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by entero virulent bacteria. *Gut*, 35: 483-489.

BOTTAZZI, V. (1983). Food and feed production with microorganisms. *Biotechnology*, 5: 315-63.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A.; SOGLIA, D.; ROSATI, S.; DECASTELLI, L.; CIVERA, T. (2004). Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Molecular and Cellular Probes*, 18: 283-288.

CAREY, C. M.; KIRK, J.L.; OJHA, S. and KOSTRZYNSKA, M. (2007). Current and future uses of real time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 537-550.

CENCIC, A. and LANGERHOLC, T. (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - A review. *International Journal of Food Microbiology* 141: S4-S14.

- CHAMPAGNE, C. P. and FUSTIER, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8: 487-490.
- CONWAY, P. L.; GORGABCH, S. L.; GOLDIN, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70: 1-12.
- COURVALIN, P. (2006). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38 Suppl. (2): S261-S265.
- CROSS, M. L. (2002). Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34 (4): 245-253.
- CROWLEY, L. (2008). Danisco meets growing South American demand for probiotics.
- CRUZ, A.G.; FARIA, A. F. J.; VAN DENDER, A. G. F. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40:951-956.
- DANG, W. and SUN, L. (2011). Determination of internal controls for quantitative real time RT-PCR analysis of the effect of *Edwardsiella tarda* infection on gene expression in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 720-728.
- DAVE, R. I. and SHAH, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81(11): 2804 - 2816.
- de VOS, W.M.; BRON, P. A. and KLEEREBEZEM, M. (2004). Post-genomics of lactic acid bacteria and other bacteria to discover gut functionality. *Current Opinion and Biotechnology*, 15:86-93.
- de VRESE, M.; WINKLER, P.; RAUTENBERG, P.; HARDER, T.; NOAH, C.; LAUE, C.; OTT, S.; HAMPE, J.; SCHREIBER, S.; HELLER, K.; SCHREZENMEIR, J. (2006). Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. *Vaccine*, 24:6670-6674.
- DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, BARBA, S.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARE, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38 Suppl. (2): 248-255.
- DEL PIANO, M.; STROZZI, P.; BARBA, M.; ALLESINA, S.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; MORELLI, L.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; BALZARINI, M.; BALLARE, M.; ORSELLO, M.; MONTINO, F.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CAPURSO, L. (2008). *In vitro* sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. (Abstract) *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42 (8):170-173.

DESHPANDE, G.; RAO, S.; PATOLE, S. (2007). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomized controlled trials. *Lancet*, 369:1614-1620.

DEWIT, O.; POCHART, P. and DESJEUX, J.F. (1988). Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. *Nutrition* 4: 131-136.

DOLEYRES, Y.; PAQUIN, C.; LE ROY, M.; LACROIX, C. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:168-173.

FAO Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.

FAO Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canadá, 2002.

FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; de VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (1): 219 -226.

FITTIPALDI, M.; CODONY, F.; ADRADOS, B.; CAMPER, A. K. and MORATÓ, J. (2010). Viable Real-Time PCR in environmental samples: Can all data be interpreted directly? *Microbiology and Ecology*, 61:7-12.

FLOCH, M. H. (2002). Bile salts, intestinal microflora and enterohepatic circulation. *Digestive and Liver Disease*, 34(S 2): S54-57.

FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P. and BIAVATI, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141:S15-S28.

GILL, H. S.; DARRAGH, A.J.; CROSS, M. L. (2001). Optimizing immunity and gut function in the elderly. *The Journal of Nutrition Health & Aging*, 5 (2): 80-91.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J. and GOPAL, P. K. (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 83(2): 167-76.

GOEL, A. K.; DILBAGHI, N.; KAMBOJ, D.V.; SINGH, L. (2006). Probiotics: Microbial therapy for health modulation. *Defence Science Journal*, 56: 513-529.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. and SHAH, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.9:455-470.

GUARINO, A.; CANANI, R. B.; SPAGNUOLO, M.I .; ALBANO, F.; DI BENEDETTO, L. (1997). Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *Journal of Pediatric gastroenterology and Nutrition* .;25(5):516-519.

GUARNER, F. and MALANGELADA, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 512-519.

GUEIMONDE, M. and SALMINEN, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38 Suppl. 2: 242-247.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B. and HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R (Ed.), *Probiotics: the scientific basis*. (1st Edn.), Chapman and Hall, London, p: 209-224.

HEYMAN, M. and MÉNARD, S. (2002). Probiotic microorganisms: How they affect intestinal atophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 1151 - 1165

HOFSTÄTTER, H. B.; TSCHERNUTTER, M. and KUNERT, R. (2010). Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 87:419-425.

HOLZAPFEL, W. H; SCHILLINGER, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35 (2-3): 109-116.

HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G.T. (2002). Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 51:448-454.

ISOLAURI, E. (1996) Studies on *Lactobacillus* GG in food hypersensitivity disorders. *Nutrition Today*, 31:285-315.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2): .299-313.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. (2010). Application of probiotics in food products - Challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 175-181.

JAYAMANNE, V. S. and ADAMS, M. R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 189-94.

KAWASAKI, S.; MIMURA, T.; SATOH, T.; TAKEDA, K. and NIIMURA, Y. (2006). Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6854-6858.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.

KUMAR, V. P.; PRASANTHI, S.; ROHINI, A.; GANDHI, K. S. and MANJARI, A.D. (2010). Probiotics in improving the standards of human life. *Developmental Microbiology and Molecular Biology*, 1 (1): 13-19.

LACROIX, C. and YILDIRIM, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality, *Current Opinion in Biotechnology*, 18:176-183.

LANKAPUTHRA, W. E. V. and SHAH, N. P. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* in yoghurt using two-step fermentation and neutralized mix. *Food Australia*, 49: 363-366.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, 30: 2-7.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A. AND GORDON, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124: 837-848.

LILLY, D. M. E.; STILLWELL, R. H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748.

LIONG, M. T. and SHAH, N. P. (2004). Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. *Bioscience Microflora*, 24 (1): 1-10.

LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402- 408.

LYE, H. S.; KUAN, C. Y.; EWE, J. A.; FUNG, W. Y and LIONG, M. T. (2009). The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International Journal Molecular Science*, 10: 3755-3775.

MACK, D. R.; MICHAIL, S.; WEI, S.; MCDUGALL, L. and HOLLINGSWORTH, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal *mucin* gene expression. *American Journal of Physiology*, 276: 941-950.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1035S-1045S.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER E.; FRANGEUL, L.; NALIN, R.; JARRIN, C.; CHARDON, P.; MARTEAU, P.; ROCA, J. and DORE, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55: 205-211.

- MARCELINO, F.C. (2009). PCR quantitative em tempo real: Metodologias e aplicações. *Curso: Embrapa Soja, Londrina*. pg 1-29.
- MASCO, L.; VANHOUTTE, L.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J.; HUYS, G. (2007). Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 113 : 351-357.
- MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; KADO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; and TANAKA, R.. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 167-173.
- MAUKONEN, J.; MÀTÒ, J.; KAJANDER K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. (2008). Diversity and temporal stability of fecal bacterial populations in elderly subjects consuming galacto-oligosaccharide containing probiotic yogurt. *International Dairy Journal*, 18: 386-395.
- MEDELLIN-PENA, M. J.; WANG, H.; JOHNSON, R.; ANAND, S. and GRIFFITHS, M. W. (2007). Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (13): 4259-4267.
- MEDINA, M.; IZQUIERDO, E.; ENNAHAR, S.; SANZ, Y. (2007). Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: Relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clinical and Experimental Immunology*, 150: 531-538.
- METCHNIKOFF, E. (1905). Immunity in infective diseases. Cambridge University Press, New York.
- MITSUOKA, T. (1990). Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*, 6: 263 -267.
- MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L.V. (1974). Human fecal flora: The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*. 27 (5): 961-979.
- MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M.F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R. and NUNES, A. C. (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, 5(15): 1-9.
- NURMI, E.; NUOTIO, L. and SCHNEITZ, C. (1992). The competitive exclusion concept: Development and future. *International Journal of Food Microbiology*, 15: 237-240.
- O'FLAHERTY, S. and KLAENHAMMER, T.R. (2010). The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *International Dairy Journal*, 20: 262-268.
- O'FLAHERTY, S.; GOH, Y. J. and KLAENHAMMER, T. R. (2009). Genomics of probiotic bacteria, In: Prebiotics and Probiotics Science and Technology.

Charalampopoulos, D.; Rastall, R.A (Eds). 1st Ed. Springer-Verlag New York INC, New York, 1265p.

OECD - Guideline for the testing of chemicals, N° 408, 1998. Disponível em: <<http://www.ask-force.org/web/OECD/OECD-Repeated-90day-on-Rodents-408-1998.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2010.

OHASHI, Y. and USHIDA, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80: 361-371.

OTT, S. J.; MUSFELDTA, M.; TIMMISB, K. N.; HAMPEA, J.; WENDEROTHB, D. F.; SCHREIBER, S. (2004). *In vitro* alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50: 237-245.

OUWEHAND A. C. and SALMINEN, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8:749-758.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. and ISOLAURI, E. (2002a). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279-289.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; TÔLKÔ, S.; ROBERTS, P.; OVASKA, J. and SALMINEN, E. (2002b). Resected human colonic tissue: New model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9 (1):184-186.

ÔZER, B. H. and KIRMACI, H. A.(2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (1): 1-15.

PARKER, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*, 29:4-8.

PENDERS, J.; STOBBERINGH, E. E.; VAN DEN BRANDT, P. A.; THIJS, C. (2007). The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*, 62:1223-1236.

PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002-2007.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F. and MATUCHANSKY, C. (2005). Bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22: 495-512.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K. and ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43: 1-7.

RASTMANESH, R. (2011). High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chemico-Biological Interactions*, 189: 1-8. Revista Fator. Disponível em: <http://www.revistafator.com.br/ver_noticia.php?not=142778>. Acesso em: 05 abr. 2011.

RIVERA-ESPINOZA, Y, GALLARDO-NAVARRO, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27: 1-11.

SAARELA, M.; RANTALA, M.; HALLAMAA, K.; NOHYNEK, L.; VIRKAJARVI, I.; and MÄTTÖ, J. (2004). Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1205 - 1214.

SAIKALI, J.; PICARD, C.; FREITAS, M. and HOLT, P. (2004). Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. *Nutrition and Cancer*, 49:14-24.

SAKAR, S. (2010). Approaches for enhancing the viability of probiotics: A review. *British Food Journal*, 112 (4): 329-349.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; BENNO, Y. and LEE, Y.K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 10: 107-110.

SARKAR, S. and MISRA, A.K. (1994). Implication LP-System on the manufacture of fermented milk products. *Indian Journal of Dairy Science*, 47: 133-139.

SAVINI, M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M.C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C. and CRESCI, A. (2010). Pilot-scale Production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients*, 2: 330-339.

SAXELIN, M.; AHOKAS, M.; SALMINEN, S. (1993). Dose-response on the fecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in 2 different formulations. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6(3): 119-122.

SAXELIN, M.; TYNKKYNNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. and de VOS, W.M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:204-211.

SCHMIDT, G. and ZINK, R. (2000). Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. *International Journal of Food Microbiology*, 55:41-45.

SCHREZENMEIR, J.; de VRESE, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - Approaching a definition. *American Journal Clinical Nutrition*, 73: 361-364.

SHAH, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83: 894-907.

SHAH, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International of Dairy Journal*, 17:1262-1277.

SHERMAK, M., A.; SAAVEDRA, J.M.; JACKSON, T. L.; HUANG, S. S.; BAYLESS, T. M. and PERMAN, J. A. (1995). Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose malabsorbing children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1003-1006.

SHI, H. N.; WALKER, W. A. (2004). Bacterial colonization and the development of intestinal defenses. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 18:493-500.

- SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D; PANDEY, A. and SOCCOL, V. T. (2010). The Potential of probiotics, *Food Technology and Biotechnology*, 48 (4): 413-434.
- TALWALKAR, A. and KAILASAPATHY, K. (2003). Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 36-39.
- TAVAN, E.; CAYUELA, C.; ANTOINE, J.M.; CASSAND, P. (2002). Antimutagenic activities of various lactic acid bacteria against food mutagens: heterocyclic amines. *Journal of Dairy Research*, 69: 335-41.
- TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; and RAUTONEN, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9: 107-116.
- VARMA, M.; FIELD, R.; STINSON, M.; RUKOVETS, B.; WYMER, L. and HAUGLAND, R. (2009). Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Research*, 43:4790-4801.
- VAUGHAN, E. E.; HEILIG, H. G. H. J.; BEN-AMOR, K. and de VOS, W.M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 477-490.
- VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M. J.; TURRONI, F. KLAENHAMMER T. R.; van SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. (2009). Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Reviews*, 7: 61-71.
- VITALI, B.; CANDELA, M.; MATTEUZZI, D.; BRIGIDI, P. (2003). Quantitative Detection of Probiotic *Bifidobacterium* Strains in Bacterial Mixtures by Using Real-time PCR. *Systematic Applied Microbiology* 26: 269-276.
- WALKER, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46: S87-91.
- WALKER W. A.; GOULET, O.; MORELLI, L. O.; ANTOINE, J. M. (2006). Progress in the science of probiotics. *European Journal of Nutrition*, 45, (Suppl 1): 1-18.
- WANG, B.; LI, J.; LI,Q.; ZHANG, H. and LI, N. (2009). Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 59-66.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C. and WIEBE, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6578-6583.
- WITTEWER, C. T., HERRMANN, M. G., MOSS, A. A., RASMUSSEN, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130 -138.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER G. and POOL-ZOBEL, B. L. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: S451-S455.

YUAN, J.; WANG, B.; SUN, Z.; BO, X.; YUAN, X.; HE, X.; HE, X.; ZHAO, H.; DU, X.; WANG, F.; JIANG, Z.; ZHANG, L.; JIA, L.; WANG, Y.; WEI, K.; WANG, J.; ZHANG, X.; SUN, Y.; HUANG, L. and Zeng, M. (2008). Analysis of hostinducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in vivo. *Journal of Proteome Research*, 7: 375-385.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M. and de VOS, W. M. (2008). High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57(11): 1605- 1615.

ZOETENDAL, E. G.; COLLIER, C. T.; KOIKE, S.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *The Journal of Nutrition*, 134: 465-472.

CAPITULO 2

ANÁLISE FILOGENÉTICA *in silico* DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E NOVO PAR DE INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Resumo: As bactérias lácticas (BAL), sobretudo do gênero *Lactobacillus*, compreendem espécies altamente relacionadas tanto fisiológica quanto genotipicamente. Por consequência, a identificação deste grupo de bactérias utilizando métodos fenotípicos convencionais é ambígua e em geral bastante complexa. Neste trabalho, foi analisado um fragmento do gene *recA* de 30 linhagens bacterianas, incluindo BAL e espécies comuns no trato gastrointestinal humano (TGI), usando o método de *Neighbor-Joining*, com o objetivo de avaliar a conservação do gene entre espécies de BAL e bactérias entéricas, e estabelecer as relações filogenéticas entre estes microrganismos. Além disso, foram desenvolvidos iniciadores espécie-específicos capazes de discriminar *L. plantarum* das demais espécies em estudo por reação da polimerase em cadeia (PCR). O fragmento com 995 pb do gene *recA* utilizado, evidencia claramente agrupamentos distintos para BAL, enterobactérias e bifidobactérias. Além disso, as bactérias pertencentes ao grupo do *L. plantarum* foram discriminadas entre si. O par de iniciadores LPrecAF e LPrecAR com 23 e 18 pb, respectivamente, permitiu a amplificação de um fragmento único com 108 pb, apenas para as linhagens de *L. plantarum*, tanto em meio de cultura como em produtos lácteos fermentados. O limite de detecção observado foi de 1×10^3 UFC/mL para amostras de alimentos e 7×10^2 UFC/mL em meio de cultura. Esta abordagem mostrou-se um método rápido, simples e eficiente que pode ser utilizado para a identificação e monitoramento de *L. plantarum* em alimentos ou em ambiente de microbiota complexa.

Palavras chave: Bactérias ácido lácticas. *Recombinase A. Lactobacillus. Neighbor-Joining.*

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB), especially the *Lactobacillus* genus, include species very closely related both physiologically and genotypically. Therefore, the identification of this bacteria group using conventional phenotypic methods is ambiguous and cumbersome. In this study, we have analyzed the *recA* fragment from 30 bacteria, including LAB and common bacteria in the human gastrointestinal tract by means of *Neighbor-Joining* method, aiming to evaluate the gene conservation among them. Furthermore, we designed a specific set primers and PCR conditions able to discriminate *L. plantarum* strains from LAB closely related by polymerase chain reaction (PCR). The fragment with 995 bp of *recA* gene has grouped LAB, enterobacteria and bifidobacteria, in different clusters. Additionally, the bacteria belonging to the *L. plantarum* group were discriminated from each. The novel primer pair, LPreCAF and LPreCAR with 23 and 18 bp, respectively, has allowed the single amplification of a 108 bp fragment of *L. plantarum* strains contained in culture broth and fermented dairy samples. The detection limit observed for food samples and for cultures broth were 1×10^3 CFU mL⁻¹ and 7×10^2 CFU mL⁻¹ respectively. This approach proved to be a simple and efficient method for the identification and monitoring of *L. plantarum* in food, feeds and culture broth. Moreover, the assay could be used in the studies from human or environmental microbiota.

Keywords: Lactic acid bacteria. *Recombinase A*. *Lactobacillus*. *Neighbor-Joining Model*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Lactobacillus* compreende um importante grupo de bactérias comuns do trato urogenital (TUG) e gastrointestinal (TGI) de seres humanos e animais. Diversos relatos tratam da promoção e manutenção da homeostase no ambiente em que estes microrganismos encontram-se instalados (ELMER, et al, 1996; WALKER, et al, 2006). Além disso, são amplamente utilizados como fermentadores e/ou como probióticos na produção de alimentos, suplementos ou preparações farmacêuticas (ZINK; VENTURA, 2002).

A utilização de microrganismos probióticos em alimentos ou fármacos promoveu um crescimento deste mercado cujo faturamento mundial atingiu cerca de 15 U\$ bilhões em 2007 com perspectiva de U\$19.6 bilhões para 2013 (AGHEYISI, 2008). Simultaneamente, crescem as exigências quanto à segurança do consumidor e a identificação precisa do microrganismo de interesse, bem como o monitoramento e comprovação dos seus efeitos no hospedeiro tornam-se fundamentais.

Atualmente, os modelos de estudos baseados em terapia probiótica fundamentam-se na capacidade destes organismos em sobreviver às condições do TGI e atuar como reguladores e/ou promotores de saúde. Com isso, a identificação, monitoramento e quantificação de microrganismos probióticos em alimentos, no TGI humano, bem como em habitats diversos, contribui substancialmente para a compreensão dos fenômenos relacionados a estes organismos e suas interações.

Os probióticos compreendem, sobretudo, o grupo das BAL, especialmente as do gênero *Lactobacillus* e incluem espécies muito relacionadas, cuja identificação é em geral fundamentada na morfologia celular e de colônias, e em testes bioquímicos envolvendo a habilidade destes microrganismos em metabolizar açúcares e produzir ácidos orgânicos. Entretanto, o uso destes métodos apresenta limitações na identificação e reconhecimento específico devido às similaridades genéticas entre as espécies, pois bactérias com características intermediárias ou comuns são caracterizadas erroneamente ou não diferenciadas (ZHONG, et al., 1998).

No entanto, nas últimas décadas, abordagens genéticas e quimiotaxonômicas têm sido utilizadas para resolver as questões relativas à classificação e identificação deste grupo de bactérias (ZHONG, et al., 1998;

COLLINS, et al., 1991; BERGER, et al., 2007). O uso de marcadores moleculares baseados na amplificação de regiões específicas do genoma, através da PCR (Polymerase Chain Reaction) descrito por Mullins e Fallona (1996), tem sido amplamente utilizado para a identificação de *Lactobacillus*.

Além disso, o desenvolvimento de estratégias para a identificação de espécies-alvo com o uso de ferramentas de bioinformática, juntamente com o acesso a bases de dados disponíveis nos arquivos GenBank/ NCBI (National Center for Biotechnology Information), tem impulsionado inúmeras pesquisas. O uso dessas tecnologias tem como alvo a compreensão de fenômenos associados a ambientes de microbiota complexa e as interações entre estes organismos, bem como o ambiente em que eles se encontram (DEL PIANO, et al., 2006; WALKER, et al., 2006; O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010; QIN, et al., 2010).

Metodologias que utilizam ferramentas de biologia molecular e têm como objetivo a identificação, o monitoramento e a quantificação de uma espécie alvo, são baseadas na amplificação específica de um fragmento do DNA ou RNA. Empregam iniciadores selecionados normalmente em regiões conservadas de genes específicos, que contenham suficiente polimorfismo e cujas variações permitam diferenciar espécies taxonomicamente similares. Uma das regiões utilizadas para este fim é a região que corresponde ao gene *recA*, que codifica para a *Recombinase A*, uma proteína essencial às funções de recombinação genética e para a expressão do sistema de reparo do DNA (TESSMAN; PETERSON, 1985). Este sistema é bastante empregado na classificação de várias espécies de lactobacilos (KULLEN, et al., 2000; TORRIANI, et al., 2001).

Embora não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, o *Lactobacillus plantarum* é caracterizado como tal em muitos outros países. É uma bactéria láctica não "starter" (NSLAB), e foi o primeiro *Lactobacillus* a ter seu genoma sequenciado (KLEEREBEZEM, et al, 2003; CLAEISSON, et al, 2007). Estudos recentes têm atribuído ao *L. plantarum* habilidades para modular o sistema imune (PAOLILLO, 2009), reduzir o risco de doenças cardiovasculares (NARUSZEWICZ et al., 2002), atenuar distúrbios intestinais (YEN, et al., 2006), reduzir o colesterol LDL (BUSKOWSKA, et al., 1997), produzir folatos (HUGENSCHMIDT, et al., 2010), além de participar de muitos processos de fermentação importantes para a indústria de alimentos (QUERE, et al., 1997).

As muitas propriedades tecnológicas e de saúde associadas a *L. plantarum*, e o seu uso ainda restrito em alimentos para humanos no Brasil, tornam este microrganismo um alvo interessante às pesquisas.

Neste estudo, foi analisada uma sequência de nucleotídeos do gene *recA* de BAL, bifidobactérias e bactérias entéricas, com o objetivo de avaliar a conservação do gene e estabelecer relações filogenéticas entre estas espécies e, posteriormente, foram selecionados iniciadores específicos, capazes de discriminar linhagens de *L. plantarum* de bactérias taxonomicamente semelhantes. Adicionalmente, utilizou-se PCR convencional para a identificação e detecção da espécie alvo em produtos lácteos fermentados e em suplemento usado em ração animal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ESTUDO FILOGENÉTICO

Visando avaliar a conservação do gene *recA* para *L. plantarum* e espécies relacionadas, foram recuperadas 30 sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank/NCBI, em 22 de julho de 2009. Foram selecionadas sequências completas e apenas uma sequência parcial, correspondentes ao gene *recA* de diferentes espécies de BAL e algumas bactérias entéricas, cuja ocorrência é comum em alimentos e no TGI humano (Tab. 1).

Todas as sequências foram alinhadas e comparadas entre si com o uso do algoritmo Clustal W e do programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 4.0 (TAMURA, et al., 2007). Ajustes manuais foram efetuados. Um dendrograma com as relações filogenéticas foi construído por *Neighbor - Joining*, baseado no coeficiente de Nei, cujos valores de *bootstrap* são oriundos de 1000 repetições dos dados em análise (NEI, 1986) usando o mesmo programa (Mega/Clustal W). Os valores de *bootstrap* baseados em níveis de confiança foram alocados por similaridade calculada com base em 1000 repetições aleatorizadas.

Após alinhamento, as sequências do gene *recA* das bactérias em análise, foram utilizadas para selecionar uma região, cujo polimorfismo apresentou a capacidade de individualizar as diferentes espécies para posterior seleção de iniciadores específicos.

2.2 INICIADORES

Com base na análise comparativa das sequências nucleotídicas do gene *recA* de todas as bactérias empregadas como referência (Tab.1), foi selecionada uma região com 995 pb, conservada entre linhagens de *L. plantarum*, para obtenção de um par de iniciadores específicos a esta espécie. Com o uso do software Primer Express® 4.0. (Applied Biosystems, Califórnia, USA), foram selecionados os iniciadores direto (F) e reverso (R) com temperaturas de *melting* de 58 e 67°C, respectivamente, e fragmento de amplificação com 108 pb.

Tabela 1 – Linhagens bacterianas analisadas para estudo de conservação do gene *recA* e respectivos números de acesso no GenBank/NCBI

Linhagens bacterianas	Nº de Acesso GenBank
<i>L. acidophilus</i> NCFM	NC_006814.3
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	NZ_ACHN01000047.1
<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1
<i>L. casei</i> BL23	NC_010999.1
<i>L. casei</i> ATCC 334 ^T	CP000423.1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 ^T	NC_008054.1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA365	NC_008529.1
<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610.1
<i>L. gasseri</i> ATCC 33323 ^T	NC_008530.1
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	DQ826134.1
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	NC_005362
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NCFB 151 ^T	AJ621664.1
<i>L. paraplantarum</i> LMG 16673 ^T	AJ621662.1
<i>L. plantarum</i> JDM1	NC_012984.1
<i>L. plantarum</i> WCFS1	NC_004567.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T	AJ621668.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK022 ^T	AJ640079.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> A7	AJ640080.1
<i>L. pentosus</i> LMG 10755 ^T	AJ621666.1
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	FM179322.1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140 ^T	NC_012815.1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> AD011	NC_011835.1
<i>E. coli</i>	V00328.1
<i>E. coli</i>	X55552.1
<i>E. faecalis</i> V583	NC_004668.1
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> LMG 18311 ^T	NC_006448.1
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> LMD9	AJ278527.1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	NC_006905.1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> P125109	NC_011294.1
<i>B. thuringiensis</i>	NC_008600.1

A especificidade dos iniciadores foi inicialmente avaliada entre as espécies por comparação das sequências de uma mesma região do gene *recA*, utilizando o programa Mega. Adicionalmente, a amplificação por PCR foi avaliada em amostras de DNA das culturas bacterianas (Tabela 2) e em amostras de alimentos.

Tabela 2 – Bactérias utilizadas para avaliação da especificidade da reação PCR

Linhagens bacterianas - Abreviação*	Fonte
<i>L. acidophilus</i> - La3™	Clerici / Sacco - Brasil
<i>L. brevis</i> - Lb	ATCC 367
<i>L. casei</i> - Lc1™	Christian Hansen - Brasil
<i>L. delbrueckii</i> - Ld	ATCC 11842 ^T
<i>L. fermentum</i> - Lf	ATCC 9338
<i>L. gasseri</i> - Lg	ATCC 33323 ^T
<i>L. helveticus</i> ™ - Lh	Danisco - Brasil
<i>L. paracasei</i> - LPc	ATCC 27092
<i>L. pentosus</i> - LPe	ATCC 8041 ^T
<i>L. paraplantarum</i> - LPr	DSM 10641
<i>L. plantarum</i> - Lp	ATCC 14917 ^T
<i>L. plantarum</i> - BG112™	Clerici / Sacco - Itália
<i>L. plantarum</i> - Lp115™	Danisco - Brasil
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> - Y180™	Christian Hansen - Brasil
<i>E. faecalis</i> - Ef	ATCC 29212
<i>B. animalis</i> - BB12™	Christian Hansen - Brasil
<i>B. lactis</i> - HN019™	Danisco - Brasil
<i>E. coli</i> - Ec	ATCC 25922
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> - St	ATCC 14028

*As abreviações foram utilizadas também nas figuras 2 e 3A

2.3 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As bactérias utilizadas neste estudo são linhagens comerciais ou de coleções de culturas (Tab. 2). Todas as BAL e bifidobactérias foram cultivadas em caldo MRS (de Man Rogosa e Sharpe - Oxoid, Cambridge, UK) com auxílio do sistema Anaerobac (Probac, São Paulo, Brazil) a 37° C em anaerobiose por 48 horas. As demais bactérias comuns ao trato gastrointestinal foram cultivadas em caldo BHI (Brain-Heart Infusion - Oxoid, Cambridge, UK), a 37°C por 24 horas. Todas as linhagens foram mantidas liofilizadas e, quando necessário, foram cultivadas nas respectivas condições de cultivo.

2.4 AMOSTRAS DE ALIMENTOS

As amostras de alimentos utilizadas compreendem produtos lácteos fermentados e um suplemento utilizado para composição de ração animal. O kefir

(K) e o leite fermentado (M) foram preparados em laboratório, o suplemento para ração com uma linhagem *L. plantarum* (bulk powder™ - Christian Hansen, Brasil) (S) e o iogurte (Y) foram obtidos diretamente com os fabricantes.

As amostras de Kefir foram preparadas com leite desnatado, 10 % de sacarose, fermentados durante 24h a 24° C, empregando-se a cultura Lyofast MT036 LV (Clerici-Sacco, Itália), composta de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc spp. L.brevis* e *Saccharomyces cereviseae*. Além disso, o mesmo produto foi elaborado com a adição da cultura Lyofast MT036 LV e *L. plantarum* - Lp115 (Danisco, Brasil) (K + LP). O leite fermentado foi produzido com leite desnatado, 10% de sacarose e cultura *L. plantarum* -Lp115 (Danisco, Brasil), e foi fermentado por 16 h a 37° C. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (5°C ±1) até o uso.

As amostras de leite fermentado (1 mL) e o suplemento para ração (1 g), foram diluídas em série (1:10) com água peptonada tamponada 0,1% (P/V) (Oxoid, Cambridge, UK). Diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ foram plaqueadas em ágar MRS *pour-plate* para determinação da contagem total de *L. plantarum*.

2.5 EXTRAÇÃO DNA

2.5.1 Extração de DNA a partir de Culturas Bacterianas

O DNA genômico foi isolado de acordo com procedimento descrito por Gueimonde e colaboradores (2004), com modificações. Cada bactéria foi cultivada em caldo MRS ou BHI (Oxoid, Cambridge, UK) a 37°C até densidade ótica (D.O._{600 nm}) próxima a 1,0. Um mL de cada cultura foi centrifugado a 10.000 g por 5 min, o precipitado foi lavado duas vezes com tampão TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA pH 8,0) e ressuspenso em 200 µL de tampão TE.

A suspensão bacteriana foi submetida à fervura em banho Maria por 10 min, refrigerada em banho de gelo e centrifugada a 10.000 g por 10 min. O DNA contido no sobrenadante foi quantificado espectrofotometricamente (Gene quant™ 1300 - GE -Cambridge, UK), diluído para 12,5 ng/µL e estocado a -20°C até o momento de uso.

2.5.2 Extração de DNA a partir de Amostras de Alimentos

As amostras foram coletadas de forma asséptica, 1,0 g ou 1,0 mL foi homogeneizado adicionado de igual volume de tampão TE. A amostra S foi diluída em 9 mL de 0,1% (p/v) em água peptonada tamponada (Oxoid, Cambridge, UK) 1:10 (v/v). Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA bruto a partir de 1 mL de cada suspensão, de acordo com a descrição do item 2.5.1.

2.6 CONDIÇÕES DA PCR

Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 20 μ L, contendo 50 ng do DNA genômico de cada bactéria, 1 U de Taq DNA polimerase, 2,0 μ L de tampão de reação (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl), 0.8 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP (reagentes Invitrogen, S. Paulo, Brasil), 0.5 μ M de cada iniciador _{LP«CA} (Applied Biosystems - S. Paulo, Brasil) e água ultra pura autoclavada (qsp).

A amplificação do DNA foi realizada em aparelho termociclador (MJ Research PT 100 - Watertown, EUA), com uma etapa de desnaturação inicial 94° C por 2 min., seguido de 40 ciclos compostos de desnaturação a 94° C por 45 seg, pareamento a 67° C por 45 seg. e extensão a 72° C por 30 seg. Ao final, foi adicionado um passo extra de extensão a 72° C por 4 min.

Após a reação, cada amostra foi adicionada de 4 μ L de tampão de corrida (0,25 g de azul de bromofenol, 15 g de Ficoll 400 em 100 mL de água ultra pura autoclavada -Reagentes Merck - Darmstadt, Alemanha) e 20 μ L de cada amostra foi avaliada por eletroforese em 50 mL de gel de agarose a 2 % (p/v) (Pronadisa - Madrid, Espanha) em tampão TEB (89 mM ácido bórico, 89 mM Tris e 2.5 mM EDTA, pH 8.3), e corada com 0.8 μ L de *Sybr Safe* (Invitrogen - Oregon, EUA). Utilizou-se um marcador molecular de 100 pb como referência. A eletroforese foi conduzida a 3 V/Cm e o gel visualizado e fotografado em aparelho fotodocumentador (Locus L-PIX HE- Campo Belo S.P, Brasil).

Condições idênticas foram aplicadas para amplificação das amostras de alimentos, exceto a quantidade de DNA que não foi considerada nestas amostras. Adicionou-se 4 μ L de cada amostra de DNA bruto.

2.7 ESPECIFICIDADE E DETECÇÃO DE *L. PLANTARUM*

Foram utilizadas dezenove (19) linhagens bacterianas de variadas espécies (Tab. 2) para avaliação da especificidade do par de oligonucleotídeos, além de um controle negativo contendo água em substituição às amostras de DNA. Adicionalmente, foram utilizadas alíquotas de DNA de cinco amostras de alimentos que continham *L. plantarum* e /ou outras espécies de BAL.

2.8 LIMITE DE DETECÇÃO DO *L. PLANTARUM*

Para determinar o limite de detecção da reação de PCR, cultivou-se *L. plantarum* Lp115 em caldo MRS, efetuou-se diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-10}) em tampão TE e extração de DNA conforme 2.5.1. Simultaneamente, 1 mL de cada diluição foi plaqueado em ágar MRS *pour-plate*, conforme as condições requeridas (item 2.3) para determinação da contagem total de células, e os resultados expressos em UFC/mL.

O limite de detecção da reação de PCR foi determinado pela menor concentração de DNA que resultou no fragmento com 108 pb visível no gel de agarose.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS *recA* DAS LINHAGENS EM ESTUDO

Este estudo considerou para análise, sequências nucleotídicas do gene *recA* de 30 linhagens bacterianas comuns em alimentos e/ou no TGI humano, incluindo diferentes gêneros representados pelo grupo das BAL (*Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), bem como bifidobactérias, enterobactérias e *Bacillus* (Tab. 1). Dentre as sequências recuperadas do banco de dados GenBank, apenas a sequência referente ao *L. paracasei* subsp. *paracasei* (acesso. AJ621664.1) é incompleta, com fragmento de 600 pb, e foi utilizada, uma vez que até julho 2010, não haviam disponíveis sequências completas para esta espécie. As sequências completas variaram de 996 a 1476 pb, com exceção do *S. salivarius* subsp. *thermophilus* LMD9 (acesso. AJ278527.1), cuja sequência contém 1.916 pb. As sequências completas de *recA* das espécies *Lactobacillus* compreendem cerca de 1150 pb.

Para identificar uma região comum entre todas as sequências, no alinhamento com o programa Clustal W, foram efetuados ajustes manuais e uma região consensus com 995 pb foi obtida. Este fragmento foi utilizado para construção de uma árvore filogenética, e uma região com polimorfismo entre espécies permitiu a seleção de iniciadores específicos do microrganismo alvo.

3.2 A ANÁLISE FILOGENÉTICA

Uma árvore filogenética foi construída com 995 bp pelo método de *Neighbor-Joining*, com base nas distâncias de Nei (Fig. 1). Dois agrupamentos principais foram identificados. O agrupamento I, composto apenas por BAL, incluindo espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, e o agrupamento II, que compreende bifidobactérias e enterobactérias. Uma sequência de *B. thuringiensis* foi utilizada como *outgroup*.

O agrupamento I apresentou quatro grupos principais (A, B, C e D). O grupo A, foi composto por sequências relativas à *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*. O segundo grupo (B) compreendeu sequências de *L. delbrueckii*. O grupo C foi formado por *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* e o grupo D composto

por quatro diferentes espécies de *Lactobacillus*. Cada um dos quatro grupos é composto por espécies altamente relacionadas e são reconhecidos como grupos do *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei* e *L. acidophilus*, respectivamente (NASER, et al., 2007; SINGH, et al., 2009).

Dentro de cada um dos quatro grupos contidos no agrupamento I, podem ser observados altos valores de *bootstrap*, com variação de 74% a 100%. As técnicas de *bootstrap* são importantes metodologias estatísticas que permitem estimar, dentro de um número de repetições previamente estabelecido, em quantas repetições um determinado parâmetro obtido, permanece inalterado. Neste caso, o programa estatístico utilizou 1000 repetições para obtenção da árvore filogenética. No ramo composto pelas linhagens *L. plantarum* JDM1, *L. plantarum* WCFS1 e *L. plantarum* ATCC 14917^T (Figura 1), o valor de *bootstrap* foi de 100%, o que indica que num total de 1000 repetições na montagem do dendrograma, esta mesma composição foi mantida em todas as repetições. Os altos valores de *bootstrap* intragrupos, são resultantes da alta similaridade entre as sequências em análise, sobretudo nas linhagens de mesma espécie.

Dentre as BAL (agrupamento I), apenas *L. brevis*, *L. fermentum* e *E. faecalis* foram alocados em ramos distintos aos grupos A, B, C e D apresentados. No entanto, NASER e colaboradores (2007), utilizando o gene *pheS* que codifica para as subunidades a da fenilalanina sintase, e o gene *rpoA*, que codifica para as subunidades a da RNA polimerase, classificaram os dois *Lactobacillus* como integrantes dos grupos do *L. buchneri* e *L. reuteri*, respectivamente. Nenhuma dessas espécies foi utilizada neste trabalho. O gênero *Enterococcus* é comumente associado a BAL devido ao baixo conteúdo de CG (MARTHUR; SINGH, 2005), no entanto, a alocação desta espécie em relação às espécies de lactobacilos, tem sido variável. *E. faecalis* foi previamente relacionado a espécies de *L. sakei* utilizando o gene do 16S rRNA, entretanto, com base no gene *abc* (ATP Binding Protein), *E. faecalis* ficou isolado de outras espécies. Este dado corrobora com os resultados obtidos neste estudo, evidenciando que tanto o gene *abc* quanto *recA* são adequados para discriminação desta espécie, embora no relato o gene *abc* (ATP Binding Protein) não tenha se mostrado adequado para discriminação de *L. plantarum* que foi agrupado com *L. sakei* (DEWANGAN, et al., 2009).

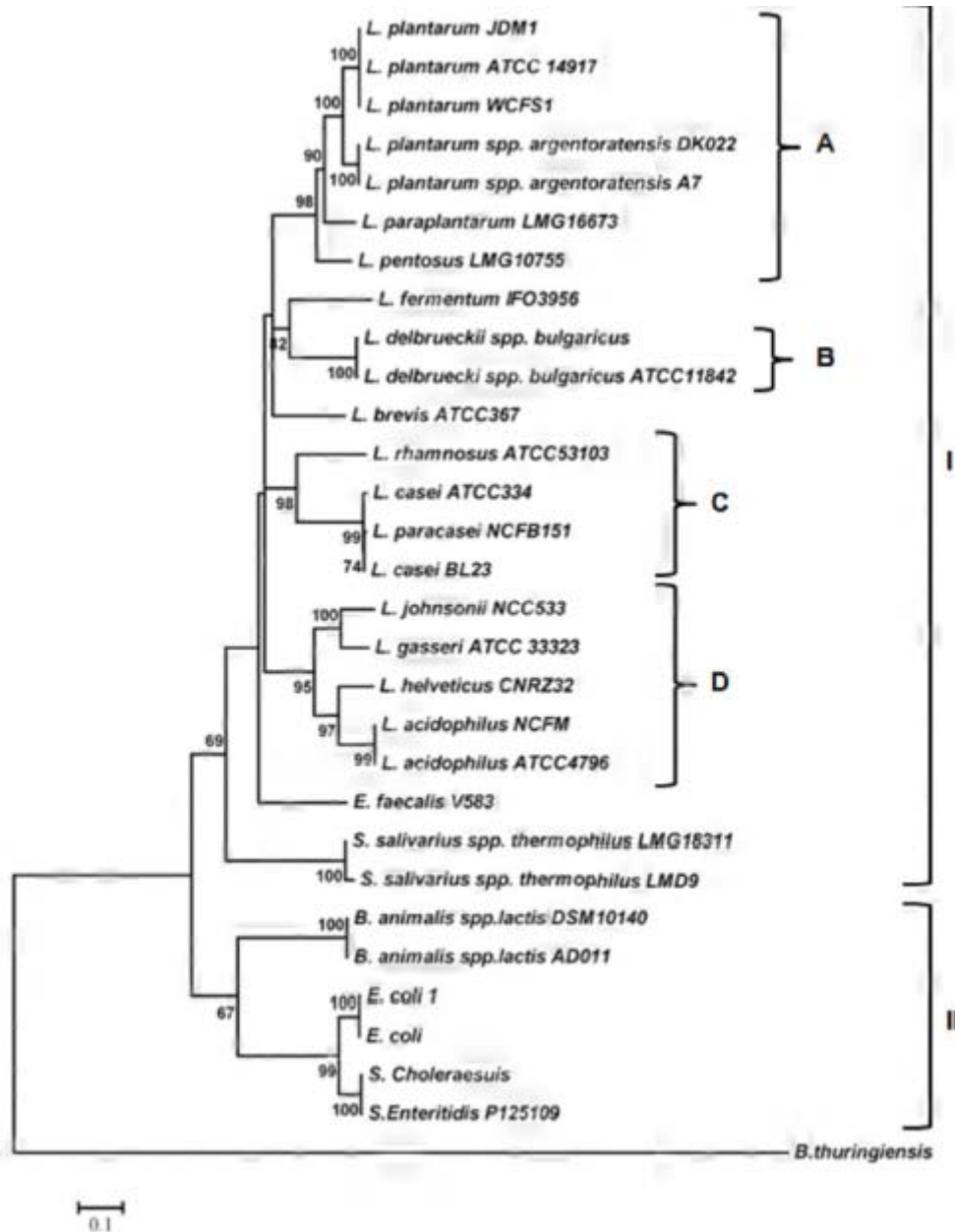
As linhagens *L. plantarum* agruparam-se em um ramo único. *L. paraplantarum* e *L. pentosus*, reconhecidamente pertencentes ao grupo de *L.*

plantarum, foram agrupados em ramos diferentes, mas inseridos no mesmo grupo contendo bactérias heterofermentativas facultativas (Grupo A - Fig. 1). Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores (HUANG, et al., 2010; SINGH, et al., 2009; TORRIANI, et al., 2001).

Diferenças sutis na composição de nucleotídeos do *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*, permitiu sua alocação muito próxima mas em um subgrupo distinto das linhagens de *L. plantarum*. A distinção entre espécie e/ou subespécies de *Lactobacillus* evidência a alta capacidade discriminatória do fragmento do gene *recA* em análise neste estudo. HUANG, et al., (2010) observaram um padrão similar de agrupamento para o grupo de *L. plantarum* ao utilizarem o gene *dnaK*, no entanto, com base no gene do 16S rRNA, os autores não observaram distinção no nível de subespécies. De fato, este gene é muito conservado, apresenta similaridade de até 99% entre espécies de *Lactobacillus* (COLLINS, et al., 1991; HUANG, et al., 2010) e, portanto, não adequado para tal discriminação. Em estudo preliminar, nessa pesquisa, também se utilizou iniciadores baseados no gene do 16S rRNA, com informações da literatura (BRON, et al, 2004). Todavia, tanto nas condições propostas como em diversas variações, não foi possível obter discriminação entre os organismos de interesse (Fig 2).

Os grupos B, C e D compreendem espécies filogeneticamente relacionadas intragrupos. Foi observado que os ramos com sequências de mesma espécie têm valores de *bootstrap* de 99-100%, como esperado para um gene com padrões de alta conservação entre as espécies, exceto no grupamento C em que espécies distintas *L. paracasei* NCFB151^T e *L. casei* ATCC334^T se alocaram num ramo único com 74% de repetibilidade. Esta incoerência pode ser atribuída à sequência incompleta do gene *recA* utilizada para a espécie *L. paracasei*; embora, a literatura a respeito da taxonomia deste grupo, corrobore os dados obtidos.

Figura 1 – Árvore filogenética construída a partir da comparação de 30 sequências do gene *recA* de BAL, bífido e enterobactérias, demonstrando as relações genéticas entre espécies relacionadas. O dendrograma foi construído pelo método de *Neighbor-Joining* e uso do algoritmo Clustal W. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando o coeficiente de Nei, com valores de *bootstrap* baseados em 1000 repetições. Uma sequência de *B. thuringiensis* foi incluída como *outgroup*. A barra de escala representa 10% de divergência na sequência de nucleotídeos

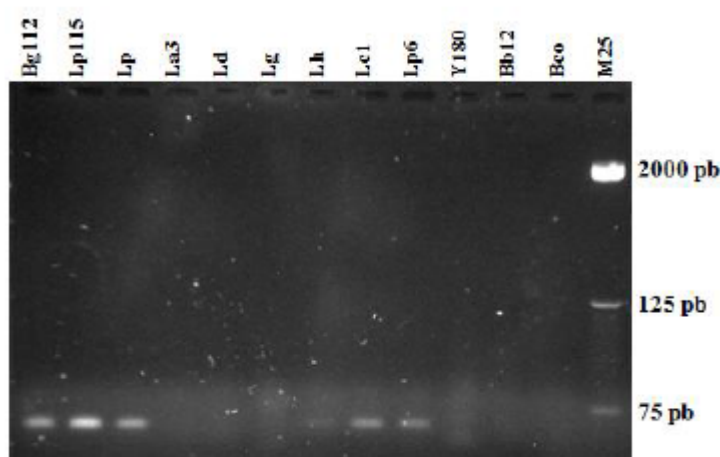


Alguns pesquisadores discutem a classificação do grupo *L. casei* e argumentam que não há provas suficientes para a distinção entre *L. paracasei* NCFB 151^T e espécies de *L. casei* (VÁSQUEZ, et al, 2005; SINGH, et al., 2009).

Além disso, Felis e colaboradores, (2001) também não diferenciaram filogeneticamente este grupo.

As bifidobactérias e enterobactérias foram alocadas no agrupamento II, formando dois grupos diferentes, com origem comum e um valor de bootstrap de 67%. Essas classes, *Bifidobacteriaceae* e *Enterobacteraceae* são frequentemente associadas à microbiota fecal humana, embora se saiba que a microbiota pode variar, dependendo da idade e estilo de vida de cada indivíduo (TIIHONEN, et al., 2010).

Figura 2 – Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 70 pb em um gel de agarose 2%, obtido a partir de iniciadores baseados no gene do 16S rRNA para linhagens de culturas de bactérias identificadas na Tabela 2, H₂O = Controle negativo M25 = Marcador com 25 pb



Bifidobactérias são comumente aceitas como membros do grupo LAB, mas são filogeneticamente distantes deste grupo, devido à presença de frutose-6-fosfato- fosfocetolase (F6PPK), responsável pela fermentação de hexoses, produzindo ácido lático e ácido acético na proporção 2:3, enquanto que no metabolismo de *Lactobacillus* ocorre principalmente produção de ácido lático. Esta é uma característica essencial para a distinção das "láticas verdadeiras" e explica a distância genética entre este grupo e o grupo de BAL. Além disso, o maior teor (% em mol) de guanina e citosina no DNA de bifidobactérias, que variam de 55 a 67%, é particularmente diferente do conteúdo do DNA dos *Lactobacillus*, membros típicos de BAL (HOLZAPFEL; STILE, 1997; GOMES; MALCATA, 1999; AKIMOV, et al, 2008).

3.3 SELEÇÃO DE INICIADORES

Um alinhamento múltiplo das sequências *recA* foi efetuado para determinação de uma região conservada em todas as linhagens de mesma espécie, mas com polimorfismo entre espécies distintas. Deste modo, um par de iniciadores foi selecionado a partir de uma sequência de 995 pb do gene *recA* de lactobacilos: iniciador direto (LPrecAF:GTGGTGCGGTCGATATTTTAGTT) e reverso (LPrecAR:TCAGCCGCGCTTGTAACC) com 23 e 18 pb, respectivamente (Fig. 3), cujo fragmento de amplificação contém 108 pb.

Apesar da alta similaridade entre as sequências das linhagens de *Lactobacillus*, na região de pareamento dos iniciadores, a ocorrência de polimorfismos permitiu a amplificação espécie-específica para as linhagens de *L. plantarum* (sombreada na Fig. 3). Analisando a região de pareamento dos iniciadores, é possível observar alterações na extremidade 3' do iniciador F e no nucleotídeo da posição 425, que diferencia linhagens *L. plantarum* de *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*. Adicionalmente, uma alteração similar ocorre na posição 516 do iniciador R. Tais polimorfismos evidenciam que é possível discriminar linhagens, inclusive subespécies, sob condições experimentais adequadas.

Figura 3 – Comparação das sequências parciais *consensus* do gene *recA* das 20 linhagens de *Lactobacillus*. Na região entre os nucleotídeos 412 e 519 estão localizados os iniciadores LPrecAF e LPrecAR. As regiões de pareamento dos iniciadores estão sombreadas e os nucleotídeos diferenciáveis entre espécies estão em destaque

Microrganismos	412 ↓	Iniciador F	434 ↓	502 ↓	Iniciador R	519 ↓
<i>L. plantarum</i> JDM1	CAGTGGT	GCGGTCGATATTTTAGTTGT	//	TTGGGTTACAAGCCGCGGCTGATG		
<i>L. plantarum</i> WCFS1	CAGTGGT	GCGGTCGATATTTTAGTTGT	//	TTGGGTTACAAGCCGCGGCTGATG		
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	CAGTGGT	GCGGTCGATATTTTAGTTGT	//	TTGGGTTACAAGCCGCGGCTGATG		
<i>L. plantarum</i> spp. <i>argentoratensis</i> DK022	CAGTGGT	GCGGTCGACATTTTAGTCT	//	TTGGGTTACAAGCCGCGGTTGATG		
<i>L. plantarum</i> spp. <i>argentoratensis</i> A7	CAGTGGT	GCGGTCGACATTTTAGTCT	//	TTGGGTTACAAGCCGCGGTTGATG		
<i>L. paraplantarum</i> LMG16673	TAGTGGT	GCGGTCGATATTTTAGTTGT	//	TTGGGTTACAAGCTCGACTCATG		
<i>L. pentosus</i> LMG10755	CAGTGG	GCGGTTGATATTTAGTTGT	//	TTGGTTTACAAGCCAGATTAAATG		
<i>L. johnsonii</i> NCC533	GAGTGGT	GCAATTGATATCTTAGTTGT	//	TTGGGTTACAAGCCCGGTTAATG		
<i>L. paracasei</i> NCFB151	GTCTGGT	GCCATTGATATTGTCGTGAT	//	TTGGCTTGCAAGCCCGATTAATG		
<i>L. casei</i> BL23	GTCTGGT	GCCATTGATATTGTCGTGAT	//	TTGGCTTGCAAGCCCGATTAATG		
<i>L. casei</i> ATCC334	GTCTGGT	GCCATTGATATTGTCGTGAT	//	TTGGCTTGCAAGCCCGATTAATG		
<i>L. acidophilus</i> NCFM	TAGTGGT	GCTATTGATATTGTCGTAGT	//	TAGGCTTCAAGCTAGACTTATG		
<i>L. acidophilus</i> ATCC4796	TAGTGGT	GCTATTGATATTGTCGTAGT	//	TAGGCTTCAAGCTAGACTTATG		
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	CAGCGGG	GCCATCGACATCGTCGTGGT	//	TTGGACTCCAGGCCCGCCTGATG		
<i>L. delbruecki</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC11842	CAGCGGG	GCCATCGACATCGTCGTGGT	//	TTGGACTCCAGGCCCGCCTGATG		
<i>L. rhamnosus</i> ATCC53103	ATCGGG	GCCATTGATATTTTAGTTGGT	//	TTGGGTTACAGGCACGGCTAATG		
<i>L. brevis</i> ATCC367	CAGTGGT	GCGGATTGACATTGTCGTGGT	//	TGGGCTGCAAGCCCGGTTGATG		
<i>L. gasserii</i> ATCC 33323	CAGTGGT	GCAATTGATATTTTGGTTGT	//	TTGGTTTACAGGCAAGATTAATG		
<i>L. fermentum</i> IFO3956	TCGGG	GAGCCGTCGACATCGTCGTGGT	//	TGGGTTACAGGCCGCTTGATG		
<i>L. helveticus</i> CNR232	TAGTGGT	GCCATTGATATTGTCGTAGT	//	TTGGCTTCAAGCTCGATTAATG		

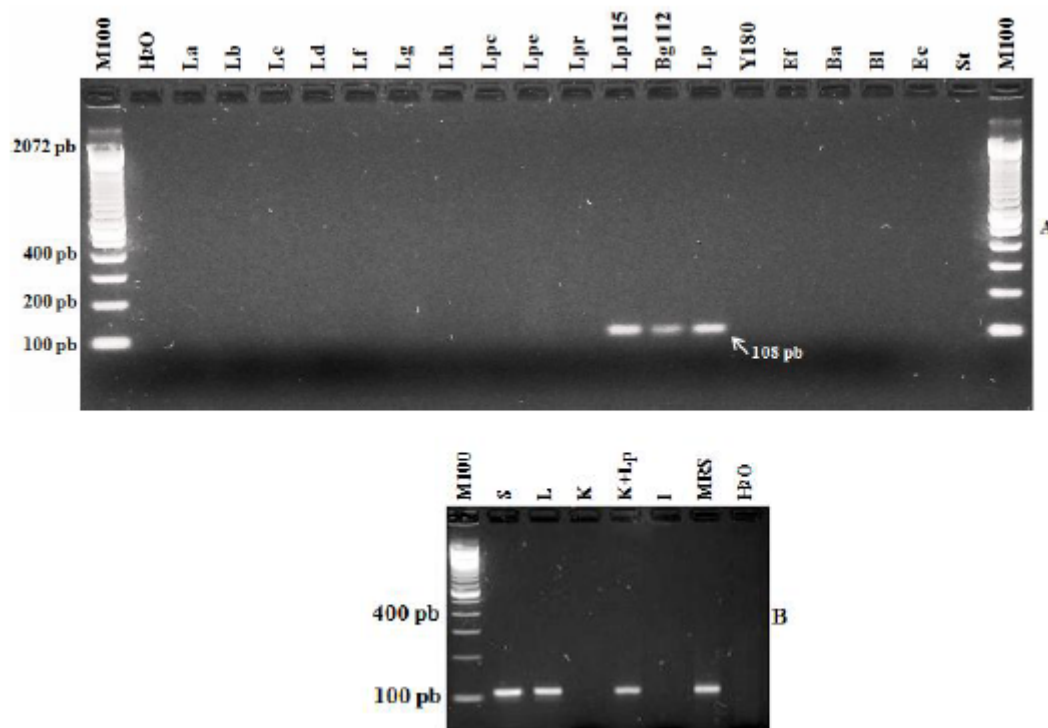
Comparações entre as sequências de *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e linhagens de *L. pentosus* demonstram que há diferenças de pelo menos dois nucleotídeos em cada espécie para os iniciadores direto e reverso (Fig 3). Tais observações indicam que, com ajustes apropriados e uma reação de PCR otimizada, pode-se garantir especificidade e, portanto, a discriminação específica. Para as espécies que são menos relacionadas, o nível de polimorfismos aumenta facilitando a discriminação por PCR.

3.4 ESPECIFICIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO DA PCR

A especificidade dos iniciadores foi avaliada por meio da reação de PCR (Fig. 4 A) a partir do DNA total extraído de 19 linhagens de bactérias em meios de cultivo (Tabela 2), bem como de amostras de alimentos lácteos fermentados (Fig. 4 B).

A otimização da reação de PCR utilizando os iniciadores LPrecAF e LPrecAR, levou a amplificação de um fragmento único com 108 pb, exclusivamente quando linhagens de *L. plantarum* estavam presentes na amostra.

Figura 4 – Eletroforese do produto de PCR com 108 pb em gel de agarose 2%, obtido a partir de 19 linhagens de culturas de bactérias **(A)**, cuja identificação é apresentada na Tabela 2, e de amostras de alimentos **(B)**: S = Suplemento para ração animal, L = Leite fermentado com *L. plantarum* Lp115, K = Kefir, K + Lp = kefir adicionado de *L. plantarum* Lp115, I = iogurte, MRS = Caldo MRS com *L. plantarum*, H2O = Controle negativo, M100 = Marcador com 100 pb



As características fenotípicas entre linhagens de *L. paraplantarum* e *L. pentosus* são extremamente similares às de linhagens de *L. plantarum*. Portanto, a escolha do marcador molecular é muito importante para diferenciação destes organismos (LEE, et al., 2004). Os resultados deste trabalho confirmam que as sequências do gene *recA* têm um alto poder discriminatório mesmo quando espécies muito relacionadas estão em análise (Fig. 4A). A identificação e detecção da bactéria alvo, comprova a especificidade do par de iniciadores. Embora, tanto as amostras de kefir (K) como as de iogurte (Y) contenham espécies relacionadas de *Lactobacillus*, somente aquelas com *L. plantarum* foram detectadas (Fig. 4B).

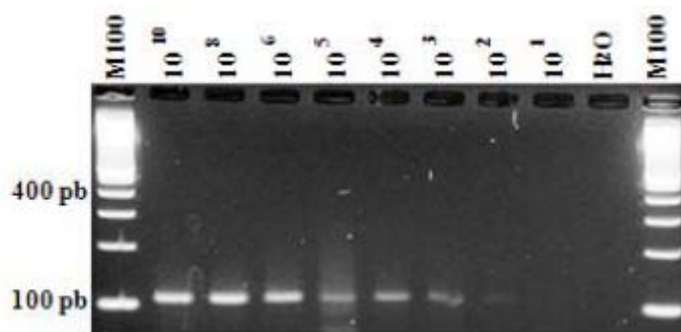
A detecção específica de *L. plantarum* em produtos lácteos fermentados ou em suplemento para ração animal, foi obtida através de um método rápido e simples. Embora as substâncias presentes nas matrizes de alimentos possam interferir no DNA alvo ou inibir a reação enzimática (PICOZZI, et al., 2006), este efeito parece não afetar os resultados neste estudo.

Os limites de detecção da técnica convencional de reação PCR variam em função do método de extração empregado e das condições de reação. De maneira geral, com o uso de PCR convencional, o limite de detecção reportado para BAL é, em média de 10^2 a 10^4 UFC/mL, tanto em meios de cultura como em produtos lácteos (DINCKINSON, et al., 1995; ZAGO, et al., 2008). Nesta investigação foi obtido um limite de detecção para *L. plantarum* de 1×10^3 UFC/g de suplemento para ração. Dados similares foram observados para os demais produtos lácteos avaliados.

Mckillip e colaboradores (2000) observaram um limite de detecção variando de 10^1 a 10^4 UFC de *E. coli*/mL de produtos lácteos. Ao utilizarem metodologias com base em guanidina/isotiocianato ou concentração para extração de DNA de soro de leite em pó, os níveis de detecção observados foram $\geq 10^6$ e 10^4 UFC / mL, respectivamente. Os autores argumentam que o baixo nível de detecção pode ser atribuído aos componentes do soro, que ocasionaram uma inibição na lise celular ou que a recuperação do DNA no processo de extração tenha sido ineficiente. Neste experimento, esta dificuldade não foi observada quando um suplemento para ração animal, cujo conteúdo principal é soro de leite em pó foi analisado.

Quando o DNA foi obtido a partir de diluições seriadas de uma cultura com 7×10^{10} UFC / mL, o limite de detecção foi de 7×10^2 UFC / mL (Fig. 5). Além disso, a amplificação do mesmo fragmento foi obtida também com 500 a 0,005 ng de DNA na reação (dados não mostrados). Esta é uma clara indicação de que a reação pode ocorrer mesmo com quantidades muito pequenas do DNA alvo.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% com os limites de detecção da PCR obtido a partir de diluições seriadas (7×10^{10} UFC / ml a 7×10^1 UFC / mL) de uma cultura de *L. plantarum* Lp115 em caldo MRS, H₂O = Controle negativo, M100 = Marcador com 100 pb



4 CONCLUSÕES

A combinação de ferramentas moleculares e de bioinformática permitiu a identificação específica de *L. plantarum* e sua diferenciação de espécies estreitamente relacionadas, como *L. paraplantarum* e *L. pentosus*. Além disso, apesar do uso de um método simples de extração de DNA, o conjunto de iniciadores desenvolvido permitiu a obtenção de uma reação de PCR com baixos limites de detecção e alta especificidade, o que levou ao desenvolvimento de um método simples, rápido e sensível para identificação e monitoramento de *L. plantarum* em amostras de culturas bacterianas ou de alimentos.

Os iniciadores LPrecAF e LPrecAR apresentam potencial para estudos que visam o monitoramento da espécie em alimentos, silagens ou nas investigações do trato gastrointestinal humano e animal. O tamanho dos iniciadores, a alta especificidade apresentada indica que podem ser utilizados também em metodologias de PCR quantitativo para investigação da espécie em alimentos, silagens ou em estudos com vista a definir as características da microbiota autóctone e as possíveis mudanças nas espécies alóctones, bem como, fornecer informações para compreender a dinâmica destes ecossistemas complexos.

5 REFERÊNCIAS

- AGHEYISI, R. (2008). The probiotics market: Ingredients, supplements, foods - FOD035B. Food & Beverage, June 2008. Available in: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Access: 08 th June 2010.
- AKIMOV, V. N.; SIDARENKA, A.V.; NOVIK, G. I. (2008). Application of molecular methods to classification and identification of bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*, 77, 251 - 260.
- BERGER, B., PRIDMORE, R. D., BARRETTO, C., DELMAS-JULIEN, F. (2007). Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology* 189, 1311-1321.
- BRON, P. A.; MARCO, M.; HOFFER, M. S.; MULLEKOM, E.V.; de VOS, W. M. and KLEEREBEZEM, M. (2004). Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*, 183 (23): 7829-7835.
- BUKOWSKA, H., PIECZUL-MRÓZ, J., JASTRZĘBSKA, M., CHELSTOWSKI, K., NARUSZEWICZ, M. (1997). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137, 437 - 438.
- CLAESSON, M. J., SINDEREN, D. and O'TOOLE, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *FEMSMicrobiology Letters* 269, 22 - 28.
- COLLINS, M. D., RODRIGUES, U. M., ASH, C., AGUIRE, M., FARROW, J. A. E., MARTINEZ-MURCIA, A., PHILLIPS, B. A., WILLIAMS, A. M. and WALLBANKS, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16s rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 77, 5-12.
- DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI, G. P., ALLESINA, BARBA S, DEIDDA, F., LORENZINI P, BALLARÉ, M., MONTINO, F., ORSELLO, M., SARTOR, M., GARELLO, E., CARMAGNOLA, S., PAGLIARULO, M., CAPURSO, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease* 38, 248 - 255.
- DEWANGAN, R., PATEL, A., KHATRI, S., CHOUBEY, J., VERMA, M. K., KUMAR GUPTA, S. and RISHI, V. (2009). Phylogenetic analysis of *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains on the basis of abc (ATP Binding Protein) gene sequences. *Current Research Journal of Biological Sciences* 1,127-130.
- DICKINSON, J., KROLL, R .G. and GRANT, K. A. (1995). The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology* 20, 212 - 216.

- ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M. and MCFARLAND, L.V. (1996). Biotherapeutic agents: A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Journal of the American Medical Association*, 275: 870- 876.
- FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F.; MIZZI, L.; TORRIANI, S. (2001). Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a gange in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2113 - 2117.
- GOMES, A. M. P. e MALCATA, F.X. (1999). Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, 64: 12 - 22.
- GUEIMONDE, M., TOLKKO, S., KORPIMKI, T. and SALMINEN, S. 2004. New Real-Time Quantitative PCR procedure for quantification of Bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4165 - 4169.
- HOLZAPFEL, W. H. and STILE, M. E. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1- 29.
- HUANG, C. H., LEE, F. L., LIOU, J. S. (2010). Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial *dnaK* sequence and DNA fingerprinting techniques. *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 2892 - 2896.
- HUGENSCHMIDT, S., SCHWENNINGER, S. M., GNEHM, N., LACROIX, C. (2010). Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* 20, 852 - 857.
- KLEEREBEZEM, M., BOEKHORST, J., VAN KRANENBURG, R., MOLENAAR, D., KUIPERS, O. P., LEER, R., TARCHINI, R., PETERS, S.A., SANDBRINK, H. M., FIERS, M. W., STIEKEMA, W., LANKHORST, R. M., BRON, P. A., HOFFER, S. M., GROOT, M. N., KERKHOVEN, R., DE VRIES, M., URSING, B., DE VOS, W. M., SIEZEN, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1990 -1995.
- KULLEN, M. J., SANOZKY-DAWES, R. B., CROWELL, D. C. and KLAENHAMMER T. R. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology* 89, 511 - 516.
- LEE, J. H., KIM, M. and UM, S. (2004). PCR-based Detection and Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, and *Lactobacillus paraplantarum* in Kimchi. *Food Science and Biotechnology* 13, 754 - 775.
- MATHUR, S., SINGH, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281- 295.
- MCKILLIP, J. L., JAYKUS, L. A. and DRAKEL, M. A. (2000). A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *Journal of Applied Microbiology* 89, 49 -55.

MULLINS, K. B. and FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.

NARUSZEWICZ, M., JOHANSSON, M. L., ZAPOLSKA-DOWNAR, D. and BUKOWSKA, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1249 - 1255.

NASER, S. M., DAWYND, P., HOSTE, B., GEVERS, D., VANDEMEULEBROECKE, K., CLEENWERCK, I., VANCANNEYT, M. and SWINGS, J. (2007). Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2777- 2789.

NEI, M. (1986). Definition and estimation of fixation indices. *Evolution* 40, 643- 645.

O'FLAHERTY, S., KLAENHAMMER, T. R. (2010). The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *International Dairy Journal* 20, 262 - 268.

PAOLILLO, R., CARRATELLI, C. R., SORRENTINO, S., MAZZOLA, N and RIZZO A. (2009). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *International Immunopharmacology* 9, 1265 - 1271.

PICOZZI, C.; D'ANCHISE, F. and FOSCHINO, R.. (2006) PCR detection of *Lactobacillus sanfranciscensis* in sourdough and panettone baked product. *Eur Food Res Technol* 222: 330-335

QIN, J.;, LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K. S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D. R., LI, J., XU, J., L, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J.

M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU,

Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORÉ, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., Meta HIT Consortium, BORK, P., EHRLICH, S. D., WANG, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59- 66.

QUERE, F., DESCHAMPS, A. and URDACI, M. C., (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 783 -790.

SINGH, S., GOSWAMI, P., SINGH, R., HELLER, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT- Food Science and Technology* 42, 448 -457.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596 - 1599.

TESSMAN, E. S. and PETERSON, P. K. (1985). Isolation of protease-proficient, recombinase-deficient *recA* mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 163, 688 - 895.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9: 106 - 117.

TORRIANI, S., FELIS, G. E. and DELLAGLIO, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450 - 3454.

VASQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. (2005). DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 430 - 441.

WALKER, W. A., GOULET, O., MORELLI, L., ANTOINE, J. M., (2006). Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 45 Supl 1, 1-18.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHEK, M. A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.; BLUMENSCHNEIN, W.; MURPHY, E.;

SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A. and RENNICK, D. (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 1310 - 1316.

ZAGO, M.; ROSSETI, L.; REINHEIMER, J.; CARMINATI, D. and GIRAFFA, G. (2008). Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *Journal of Dairy Research* 75, 196 - 201.

ZHONG, W.; MILLSAP, K.; BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H. and REID, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* Species by Molecular Typing. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2418 - 2423.

ZINK, R. and VENTURA, M. (2002). Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 141-154.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEITE FERMENTADO COM *Lactobacillus Plantarum*

Resumo: *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria do ácido láctico, não starter (NSLAB), cujos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro têm recebido especial atenção. Nesta investigação, *L. plantarum* Lp115 foi utilizado para produzir leite fermentado. O leite fermentado pronto para consumo apresentou alta contagem de *Lactobacillus* com 9,4 Log₁₀ UFC/mL, teor de acidez de 0.99%, pH 4.3, conteúdo proteico com 2,02%, carboidratos e extrato seco totais com 8.5% e 12.15% respectivamente e, 0,5% de cinzas. O produto se manteve estável físico-química e microbiologicamente, sob refrigeração, durante 90 dias de estocagem. Não foi detectada a presença de coliformes totais e/ou termotolerantes bem como bolores e leveduras. A contagem do *L. plantarum* variou de 9,40 a 8,66 Log₁₀ UFC/mL, no início e final do armazenamento. Houve redução de apenas um ciclo logarítmico na contagem de *L. plantarum* aos 90 dias de armazenagem, e este parâmetro culminou também com um pequeno aumento de acidez.

Palavras Chave: Bactérias do ácido láctico. Probiótico. Vida de prateleira.

Abstract: *Lactobacillus plantarum* is a non starter lactic acid bacteria (NSLAB), whose health benefits to the host have been received special attention. In this investigation, it was produced a milk fermented with *L. plantarum* Lp115. The fermented milk showed high *lactobacilli* counts with 9.4 log₁₀ CFU/mL, titratable acidity of 0.99%, pH 4.3, and 2.02% protein content, carbohydrate and total solids with 8.5% and 12.15% respectively and finally, ash content of 0.5%. The product was physical-chemical and microbiologically stable, at refrigerated storage, for 90 days. It was not detect the presence of total coliforms, thermotolerant coliforms, or yeasts and molds. The *L. plantarum* counting ranged from 9.4 to 8.66 Log₁₀ CFU/mL at the end of storage. There was a reduction of only one logarithmic cycle in the *L. plantarum* count at 90 days of storage. It was also observed a slight increase in acidity in the same period.

Keywords: Lactic Acid Bacteria. Probiotic. Shelf-life.

1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, o interesse das indústrias e consumidores por alimentos funcionais tem aumentado de maneira significativa, suportados pela influencia positiva que estes alimentos exercem sobre algumas funções biológicas do corpo humano.

Neste cenário, os produtos lácteos com alegação funcional foram responsáveis entre 2005 e 2010, por quase 43% do mercado mundial de produtos funcionais (ÒZER; KIRMACI, 2010), sendo que na América Latina houve expansão de 32% ao ano entre 2005 e 2007 (CROWLEY, 2008) e estima-se que a taxa de crescimento anual de vendas de bebidas probióticas e iogurtes seja de 5% entre 2006 e 2011 (ÒZER; KIRMACI, 2010). No Brasil, dados da Consultoria Euromonitor International, divulgados em 2010, mostram que em cinco anos o mercado de produtos destinados ao equilíbrio da microbiota intestinal teve um crescimento de 60% passando de R\$ 57 milhões, em 2004, para R\$ 92 milhões, em 2009 (REVISTA FATOR, 2011).

Os produtos lácteos constituem um dos principais veículos carreadores de bactérias probióticas. O aumento deste mercado revitalizou este setor pela introdução de produtos caracterizados não só pelo seu alto valor nutritivo e sabor agradável, mas também pela sua capacidade de exercer efeitos positivos sobre a saúde do consumidor (GOMES; MALCATA, 1999; CASIRAGHI, et al.; 2007). O leite, que contem importantes propriedades nutricionais, em combinação com linhagens bacterianas com características probióticas ou produção de metabólitos ativos fisiologicamente, representa uma das opções de tecnologia para a fabricação de novos produtos com alegação funcionais (GOMES, et al., 1998; MINERVINI, et al., 2009).

Muitas bactérias ácido lácticas (BAL), com características probióticas têm sido utilizadas visando a promoção de efeitos benéficos à saúde; tradicionalmente estes microrganismos são adicionados a iogurtes e leites fermentados (SAARELA, et al., 2000; RANADHEERA, et al, 2010).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, define leites fermentados como produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. O leite utilizado na fabricação poderá ser em natureza ou reconstituído, adicionado ou não de outros

produtos de origem láctea, bem como de outras substâncias alimentícias recomendadas pela tecnologia atual de fabricação de leites fermentados, nos termos do presente padrão de identidade e qualidade, e que não interfiram no processo de fermentação do leite pelos fermentos lácticos empregados (MAPA - Brasil, 2000).

Quanto à regulamentação de uso, tanto a FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization), quanto a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgãos que regulamentam o uso de alimentos e drogas e produtos com alegação funcional, definem probióticos como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao seu hospedeiro e preconizam a ingestão de 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na recomendação diária do produto pronto para consumo, como quantidade mínima de bactérias viáveis para designação de um alimento probiótico (FAO/WHO, 2001; ANVISA, 2005).

Lactobacillus plantarum é uma bactéria láctica não "starter" (NSLAB), e foi o primeiro *Lactobacillus* a ter seu genoma sequenciado (KLEEREBEZEM, et al., 2003; CLAEISSON, et al., 2007). Muitos estudos têm atribuído a *L. plantarum* habilidades para modular o sistema imune (PAOLILLO, et al., 2009), reduzir o risco de doenças cardiovasculares (NARUSZEWICZ, et al., 2002), atenuar desordens intestinais (YEN, et al., 2006), reduzir o colesterol LDL (BUSKOWSKA, et al., 1997), produzir folatos (HUGENSCHMIDT, et al., 2010), participar de muitos processos de fermentação importantes para a indústria de alimentos (QUERE, et al., 1997), além de contribuir significativamente para o incremento da função barreira, exercida pelo intestino e sua microbiota (ANDERSON, et al., 2010). Este microrganismo é frequentemente associado à fermentação vegetal (VESCOVO, et al, 1993), e embora, pela legislação brasileira, *L. plantarum* não seja considerado probiótico, em outros países o microrganismo é caracterizado como tal e vem sendo muito utilizado como promotor de saúde.

Sabendo que o mercado de lácteos fermentados encontra-se em expansão, e que a aplicação de bactérias benéficas ainda não exploradas neste setor podem ser interessantes do ponto de vista industrial, foi proposto a produção e caracterização de um leite fermentado utilizando a linhagem comercial *L. plantarum* Lp115.

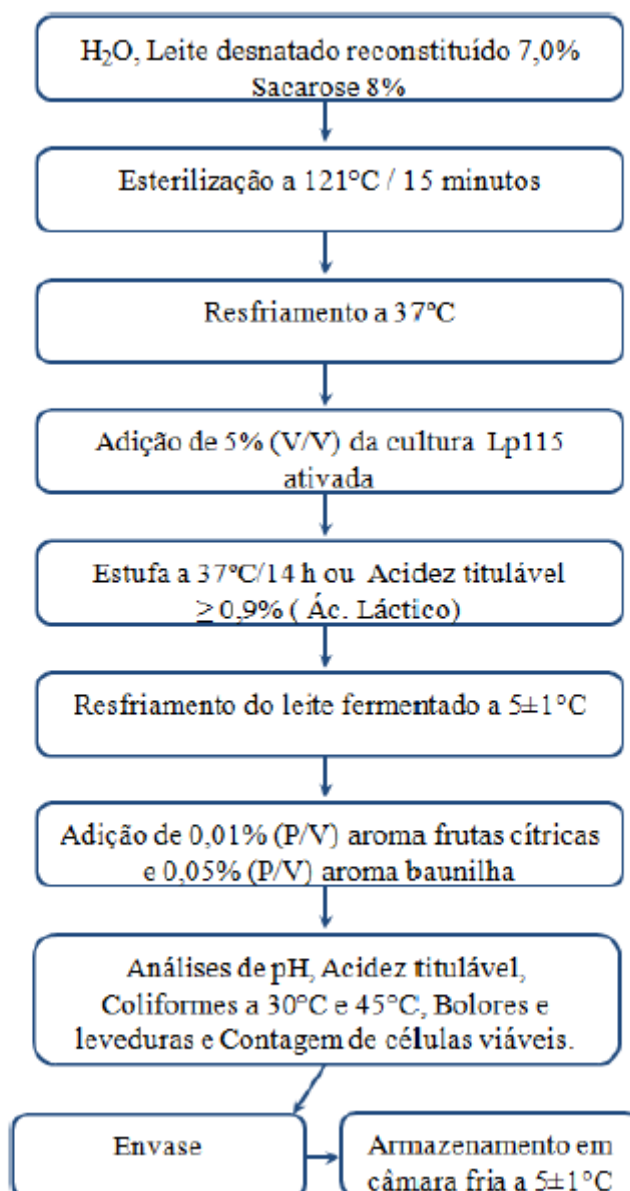
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DO INÓCULO

100 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (p/v) (Molico®, Nestlé, Brasil) foi esterilizado a 121°C/15 min. À temperatura ambiente o leite foi adicionado de aproximadamente 10 mg da cultura liofilizada de *Lactobacillus plantarum* Lp115 (Danisco, Cotia - SP), e incubado a 37°C/ 8 horas.

2.2 LEITE FERMENTADO

O leite fermentado foi preparado de acordo com o esquema de produção apresentado (Esquema 1). Leite desnatado reconstituído (LDR) a 7% (p/v) (Molico®, Nestlé, Araçatuba-SP) foi adicionado de 8% (p/v) de sacarose e esterilizado a 121°C/15 minutos. O leite foi resfriado a 37°C, inoculado com 5% (v/v) da cultura ativada, agitado e acondicionado em estufa a 37°C por 14 a 16 h ou até acidez aproximada de 1% (% ácido láctico).

Esquema 1 – Etapas de produção do leite fermentado

O leite fermentado foi resfriado em câmara fria (5°C), o coágulo foi quebrado e adicionado de aromas idênticos aos naturais: 0,01 % (v/v) frutas cítricas (Duas Rodas Industrial, Jaraguá do Sul- SC) e 0,05% (v/v) baunilha (Duas Rodas Industrial, Jaraguá do Sul- SC).

2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para avaliação da qualidade microbiológica, foram retiradas assepticamente amostras para quantificação de células viáveis de *L. plantarum*,

coliformes a 30°C e 45°C (caldo verde brilhante, Oxoid, Cambridge, UK) e contagem de bolores e leveduras (Ágar batata dextrose, Difco, Diadema, SP), conforme determina a legislação brasileira (Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001-Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos).

Para contagem de *L. plantarum*, foram utilizadas diluições seriadas em água peptonada tamponada 0,1% (p/v) (Oxoid, Cambridge, UK). Diluições de 10^1 a 10^{-10} foram plaqueadas em ágar MRS *pour-plate* e incubadas em anaerobiose (de Man, Rogosa e Sharpe -Oxoid, Cambridge, UK com sistema Anaerobac, Probac. São Paulo) a 37° C / por 48 horas.

A avaliação de coliformes e bolores e leveduras foram verificados conforme Silva e colaboradores (2001). Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As características de acidez titulável, pH, teor de cinzas, proteínas, carboidratos totais e extrato seco total (EST), foram determinadas de acordo com as normas definidas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

Paralelamente, para acompanhamento da vida de prateleira, o produto envasado foi avaliado físico-química e microbiologicamente nos tempos 1, 30, 60 e 90 dias de estocagem a 10°C.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram obtidos em triplicata, avaliados pelo teste de Hartley para verificar a homogeneidade de variâncias seguidos da análise de variâncias (ANOVA) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey com nível de significância < 5% ($P < 0,05$), dado pelo programa Statistica versão 6.0 (STATSOFT, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO

A fermentação teve duração média de 14 horas. O tempo de fermentação foi superior à produção de fermentados lácteos tradicionais, cujos processos de fermentação ocorrem em 3,5 a 6 h (DAVE; SHAH, 1997a; THAMER; PENNA, 2006), o que pode ser atribuído ao fato da cultura *L. plantarum* ser uma bactéria heterofermentativa, não "starter" (NSLAB), cuja produção de ácido láctico é inferior, quando comparada a culturas homofermentativas ou culturas iniciadoras (KLEEREBEZEM, et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2011). Além disso, o uso de culturas mistas é comum na produção destes fermentados (DAVE; SHAH, 1997a; THAMER; PENNA, 2006). Um outro ponto a considerar é a proporção de leite em pó utilizada (7%), inferior à quantidade geralmente utilizada para reconstituição do leite, o que pode influenciar o metabolismo da cultura, devido a menor disponibilidade de lactose com conseqüente maior tempo de fermentação.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

As características do produto pronto para consumo (Figura 1) e durante a vida de prateleira são apresentadas na Tabela 1. A viabilidade de *L. plantarum* foi de $2,52 \times 10^9$ UFC/mL ou 2×10^{11} UFC/dose de 80 mL. Ao longo de 90 dias estocado a 5°C. houve redução de apenas um ciclo logarítmico ($4,66 \times 10^8$ UFC/mL), o que mantém o produto com características superiores àquelas determinadas pela legislação vigente que recomenda para alimentos probióticos uma contagem mínima 1×10^6 UFC/mL (ANVISA, 2008). Embora *L. plantarum* não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, a FAO/WHO o classifica como tal em muitos países e muitos relatos de efeitos benéficos são atribuídos a este microrganismo (DANIEL, et al., 2006; ANDERSON, et al., 2010; GRANATO, et al., 2010).

Em trabalho preliminar, foram avaliados diferentes formulações de leites fermentados por *L. plantarum* BG112 (Sacco® - Campinas, SP) e observou-se viabilidade de 1×10^{10} UFC/mL no produto pronto e $1 \times 10^{8,9}$ UFC/mL após 70 dias estocados a 4°C (SOUZA, et al., 2011). Minervini e colaboradores (2009)

observaram uma contagem de 10^8 UFC/mL para linhagens de *L. plantarum* em leite de cabra, sem redução na contagem em até 45 dias de estocagem. Na avaliação da viabilidade de outras espécies de *Lactobacillus* em leites fermentados foi observada uma redução de um a dois ciclos logarítmicos após estocagem durante 21 dias (ZACHARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2006; MOAYEDNIA, et al, 2009).

Tabela 1 – Características do leite fermentado pronto para o consumo ao longo de 90 dias estocado a 10°C

Análises	Tempo (dias)			
	1	30	60	90
Log UFC/mL	9.40±0.02 ^a	9.32±0.03 ^a	9.29±0.02 ^a	8.66±0.08 ^b
pH	4.26±0.06 ^a	4.27±0.06 ^a	4.23±0.04 ^a	3.95±0.03 ^b
Acidez (%)	0.99±0.05 ^b	1.05±0.07 ^b	1.03±0.08 ^b	1.30±0.08 ^a
Proteínas (%)	2.02±0.09 ^a	2.11±0.10 ^a	2.08±0.06 ^a	2.08±0.08 ^a
Carboidratos (%)	8.51±0.05 ^a	8.40±0.07 ^a	8.44±0.05 ^a	7.36±0.16 ^b
EST (%)	12.15±0.15 ^a	11.95±0.16 ^a	12.05±0.05 ^a	12.02±0.14 ^a
Cinzas (%)	0,53±0.03 ^a	0,51±0.02 ^a	0,53±0.01 ^a	0,52±0.02 ^a

EST: Extrato seco total

Os dados são médias de 3 repetições independentes

Médias numa linha seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)

O pH do leite reconstituído foi de 6,02 em média; com o metabolismo dos açúcares pelo *L. plantarum*, o meio foi acidificado e o pH do produto pronto para consumo foi reduzido para 4,26 com acidez (g ácido láctico) igual a 0,99%. Esses parâmetros se mantiveram constantes no produto estocado até 60 dias e apresentaram pequeno decréscimo de pH e aumento de acidez aos 90 dias. O controle destes parâmetros é importante no processo de fermentação, pois a acidez elevada pode reduzir a hidratação das proteínas com consequente separação de fases devido à contração do coágulo (THAMER; PENNA, 2006). Além disso, acidez excessiva pode implicar em alterações indesejáveis nas características sensoriais do produto, bem como na redução da viabilidade da cultura em uso (VINDEROLA, et al., 2000; THAMER; PENNA, 2005; SOUZA, et al., 2011).

Os resultados indicam que houve uma sutil pós acidificação, que pode ser atribuída à atividade metabólica da bactéria. Esta alteração coincide com a redução de um ciclo logaritmo na viabilidade do *L. plantarum*, embora a contagem ao longo do armazenamento se mantenha superior ao usualmente recomendado para promoção de efeitos benéficos (OUWEHAND; SALMINEN, 1998; ANVISA, 2008). Ainda que o tempo de fermentação tenha sido longo, o pH 4,2 foi atingido em 14 h de fermentação sem adição de nenhuma outra cultura. Thamer e Penna (2005) destacam a importância de produtos lácteos fermentados por probióticos, atingirem pH de 4,6 no máximo em 24 horas e enfatizam a dificuldade ou incapacidade de culturas probióticas, sobretudo bifidobactérias, atingirem esse pH sem a necessidade de uma cultura adjuvante.

O produto não apresentou coliformes bem como bolores e leveduras, um indicativo de condições de manipulação e processamento adequados.

O leite fermentado pronto para consumo apresentou 2,02% proteínas, 8,51% carboidratos totais, 87,8 % umidade, 12,15% de extrato seco total e 0,53% de cinzas (Tab.1). Estas características não apresentaram variação durante a estocagem, exceto os carboidratos totais que foram reduzidos em 13,51% apenas nas amostras avaliadas aos 90 dias de estocagem, culminando com a pós-acidificação do leite.

A quantidade de EST e o conteúdo protéico são diretamente relacionados à composição da matéria prima utilizada para a produção do leite fermentado. Segundo a legislação vigente (MAPA - Resolução N° 5, De 13 de Novembro de 2000) a classificação de bebida láctea fermentada recomenda um mínimo de 2,9 g de proteína/100 g de produto. Os resultados deste trabalho são ligeiramente inferiores, no entanto a legislação permite teores reduzidos de proteína e gordura neste tipo de produto, portanto estão de acordo com tal caracterização.

O produto pronto para consumo (Figura 1, Tabela 1) apresentou características adequadas a um leite fermentado e, de acordo com a regulamentação técnica, o produto é caracterizado como leite fermentado desnatado, adoçado, com sabor frutas cítricas e baunilha (MAPA - Brasil, 2000).

Figura 1 – Leite fermentado pronto para consumo



O leite fermentado desenvolvido com *L. plantarum* poderia ter alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, pois atende a legislação em vigor no que se refere a sua viabilidade microbiológica durante o período de estudo sob refrigeração, além de a espécie possuir um longo histórico de uso seguro bem como, comprovação de muitos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (PAOLILLO, et al., 2009; NARUSZEWICZ, et al., 2002; YEN, et al., 2006; BUSKOWSKA, et al., 1997; QUERE, et al., 1997). Entretanto, o microrganismo, ainda não é tido como probiótico pela ANVISA (BRASIL, 2008).

O uso de bactérias probióticas associadas a alimentos tem sido fortemente recomendado devido à proteção que a matriz alimentar exerce sobre as células microbianas durante a passagem pelo TGI (FLOCH, 2002; RANADHEERA, et al., 2010). Além disso, em um produto que visa promoção de efeitos de saúde, é desejável que se mantenha a alta viabilidade durante a vida de prateleira e que sejam garantidas adequadamente suas características tecnológicas e sensoriais (SAXELIN, et al., 1999).

Embora a linhagem seja isolada de plantas (DANIEL, et al., 2006) o *L. plantarum* Lp115 estudado, apresentou capacidade de fermentar o leite e produzir características tecnológicas desejáveis.

4 CONCLUSÕES

O leite fermentado por *L. plantarum* Lp115 apresentou características físico-químicas e microbiológicas estáveis em período superior ao avaliado em produtos similares disponíveis no mercado. Embora *L. plantarum* não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, a avaliação dos efeitos deste microrganismo sobre a saúde do consumidor pode ser uma alternativa interessante e inovadora para produção de lácteos fermentados.

5 REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005, atualizada em Julho de 2008. Legislação para alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 dez. 2010.
- ANDERSON, R. C.; COOKSON, A. L.; MCNABB, W. C.; KELLY, W. J. and ROY, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* DSM2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMSMicrobiology Letters*, 309: 184 -192.
- BUKOWSKA, H.; PIECZUL-MRÓZ, J.; ASTRZĘBSKA, M., CHELSTOWSKI, K. and NARUSZEWICZ, M. (1997). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137, 437 - 438.
- CASIRAGHI, M. C.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; DONATI, E. and VILLA, L. (2007). Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 499 -506.
- CLAESSON, M. J., SINDEREN, D. and O'TOOLE, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *FEMSMicrobiology Letters* 269: 22 - 28.
- CROWLEY, L. (2008). Danisco meets growing South American demand for probiotics.
- DANIEL, C.; POIRET, S.; GOUDERCOURT, D.; DENNIN, V.; LEYER, G. and POT, B. (2006). Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9): 5799- 5805.
- DAVE, R. I. and SHAH, N. P. (1997a). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Internacional Dairy Journal*, 7(1): 31 - 41.
- FAO - Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.
- FLOCH, M. H. (2002). Bile salts, intestinal microflora and enterohepatic circulation. *Digestive and Liver Disease*, 34(S 2): S54-57.
- GOMES, A. M. P. e MALCATA, F. X. (1999). Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, 64: 12 - 22.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. and KLAVER F. A. M. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *Journal of Dairy Science*, 81: 2817 -2825.

- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. and SHAH, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.9:455-470.
- HUGENSCHMIDT, S., SCHWENNINGER, S. M., GNEHM, N., LACROIX, C., (2010). Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* 20: 852 - 857.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2008). Leites e derivados. Em: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: São Paulo, *Instituto Adolfo Lutz*, 1ª Ed digital, p. 819-877.
- KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S. A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M.; BRON, P. A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M. N.; KERKHOVEN, R.; de VRIES, M.; URSING, B.; de VOS, W.M.; SIEZEN, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1990 -1995.
- MINERVINI, F.; BILANCIA, M.T.; SIRAGUSA, S.; GOBBETTI, M. and CAPONIO, F. (2009). Fermented goat's milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26: 559 -564.
- MOAYEDNIA, N.; EHSANI, M.R.; EMAMDJOMEH, Z. and MAZAHERI, A.F. (2009). Effect of refrigerated storage time on the viability of probiotic bacteria in fermented probiotic milk drinks. *International Journal of Dairy Technology*, 62(2): 204 - 208.
- NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M. L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D. and BUKOWSKA, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1249 - 1255.
- OLIVEIRA, R. P. S.; FLORENCE, A. C. R.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M. N.; CONVERTI, A. (2011). Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal Food Microbiology*, 145: 22-27.
- OUWEHAND, A. C. and SALMINEN, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8:749-758.
- ÖZER, B. H. and KIRMACI, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (1): 1-15.
- PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; SORRENTINO, S.; MAZZOLA, .N. and RIZZO, A. (2009). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *International Immunopharmacology* 9, 1265 - 1271.
- QUERE, F., DESCHAMPS, A. and URDACI, M. C., (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 783 -790.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K. and ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43: 1-7.

BRASIL, Resolução N° 5, de 13 de novembro de 2000. MAARA- Ministério da Agricultura e do abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 21 abr. 2011.

Revista Fator. Disponível em: <http://www.revistafator.com.br/ver_noticia.php?not=142778>. Acesso em: 05 abr. 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; SANDHOLM, T.M., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.

SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R. and MATTILA-SANDHOLM, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technoogy*, 10(12): 387 - 392.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. e SILVEIRA, N.F.A. (2001). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª Ed. Ed. Varela, São Paulo, SP. 317p.

SOUZA, A.H.P.; COSTA, G.N.; MIGLIORANZA, L.H.S.; MAIA-FURLANETO, L.; OLIVEIRA, A.F. (2011). Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum- Health Science*, (in proof).

STATSOFT. Statistica for Window - Computer programa manual. Versão 6.0 Tulsa: Statsoft Inc., 2001.

THAMER, K. G. e PENNA, A. L. B. (2005). Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41 (3): 393 - 400.

THAMER, K. G. e PENNA, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 6(3): 589-595.

VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. and BOTTAZZI, V. (1993). Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*: a review. *Annual Microbiology and Enzimology*, 43: 261-284.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. (2000). Survival of probiotic in Argentina yogurts during refrigerate storage. *Food Research International*, 33(2): 97 - 102.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHKE, M. A.; OWYANG, A.; MATTSO, J.; BLUMENSCHNEIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A. and RENNICK, D. (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes

inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of Clinical Investigation* 116:1310 - 1316.

ZACHARCHENCO, P. B. and MASSAGUER-ROIG, S. (2006). Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 338 - 344.

CAPÍTULO 4

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *L. PLANTARUM* POR PCR EM TEMPO REAL EM HUMANOS APÓS CONSUMO DIÁRIO DE LEITE FERMENTADO

Resumo: *Lactobacillus plantarum* tem sido muito utilizado em estudos clínicos, como promotor de efeitos benéficos ao hospedeiro. Entretanto, o seu monitoramento no trato gastrointestinal (TGI) humano é pouco explorado. Nesta investigação 61 indivíduos receberam diariamente doses de um leite fermentado contendo 2×10^{11} UFC/dose da espécie alvo, *L. plantarum* Lp115, por diferentes períodos de consumo e microrganismo alvo foi monitorado na microbiota fecal desses indivíduos durante o consumo e pós consumo via PCR em tempo real (qPCR). O *L. plantarum* foi detectado nas fezes de apenas dois indivíduos no tempo zero, entretanto, em todos os períodos de consumo de leite fermentado o microrganismo foi detectado e quantificado na ordem de $10^3 - 10^4$ UFC/g fezes, em todos os indivíduos avaliados. Na comparação com o tempo zero, a quantificação em todos os períodos de consumo foram estatisticamente significativos ($P=0,001$). No entanto, após 15 e 45 dias da interrupção da dieta, o lactobacilo foi reduzido no nível similar à linha de base ($T=0$). O período mais prolongado de consumo não resultou em maior ocorrência do *L. plantarum* nas fezes nas avaliações pós-consumo ($P=0,001$). A análise dos resultados, tanto em quantidade de UFC, como em número de cópias do gene apresentou alta correlação ($r = 1$), ($p < 0,0001$). O método qPCR utilizado foi específico e sensível para monitoramento de *L. plantarum* no ambiente de microbiota complexa como o trato gastrointestinal

Palavras chave: qPCR. TaqMan. Probiótico. Trato gastrointestinal. Microbiota fecal.

Abstract: *Lactobacillus plantarum* has been used in clinical trials as a promoter of beneficial effects to the host. However, their monitoring in the human gastrointestinal tract (GIT) is barely explored. In this study, 61 subjects received daily doses of fermented milk containing 2×10^{11} CFU of *L. plantarum* Lp115, at different periods of consumption. The target organism was monitoring in the individual fecal microbiota, via real-time PCR (qPCR). *L. plantarum* was detected in the faeces of only two subjects at time zero, however, in all periods of consumption, the microorganism was detected and quantified in the of order 10^3 to 10^4 CFU/g feces in all subject evaluated. In comparison with zero time, all consumption periods were statistically significant ($P=0,001$). However, after 15 and 45 days of discontinuing the diet, the lactobacilli were reduced to the level observed at baseline ($T = 0$). The longer period of consumption did not result in higher occurrence of *L. plantarum* in the stool, according to the post-consumption evaluations ($P=0,001$). The results, both in number of CFU, and number of gene copies, demonstrated high correlation ($r = 1$), ($p < 0,0001$). The qPCR method used was specific and sensitive to monitoring of *L. plantarum* in a complex microbial environment such as gastrointestinal tract.

Keywords: qPCR. TaqMan. Probiotic. Gastrointestinal tract. Fecal microbiota.

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é composto por uma microbiota complexa e dinâmica cuja composição difere tanto ao longo do TGI como no lúmen e na mucosa. Como resultado, cada indivíduo tem uma microbiota característica única que varia de acordo com a idade, estado de saúde e modo de vida (GILL, et al., 2001; ISOLAURI, et al., 2004; LEY, et al., 2006; TIIHONEN, et al., 2010). O equilíbrio desta microbiota constitui uma barreira contra patógenos e substâncias nocivas, portanto, exerce uma importante função protetora e promove efeito de saúde e bem estar ao hospedeiro (JANKOVIC, et al., 2010).

A compreensão do papel da microbiota intestinal nas disfunções do trato gastrointestinal (TGI) ou dos efeitos benéficos de alguns microrganismos no equilíbrio intestinal é limitada pela carência de dados aprofundados sobre seu desenvolvimento, sua composição normal ou as alterações desta microbiota frente a uma dieta específica. O principal fator de restrição a estes estudos tem sido a laboriosidade, o tempo extensivo e a falta de precisão dos métodos tradicionais de cultivo que acessam uma percentagem muito baixa desta população (GUEIMONDE, et al., 2004; ZOETENDAL, et al., 2004; CAREY, et al., 2007; ZOETENDAL, et al., 2008). No entanto, o desenvolvimento da reação da polimerase em cadeia (PCR), o aumento do número de genomas sequenciados, bem como o incremento de métodos moleculares têm adquirido grande importância e abre novos caminhos nas abordagens que visam a compreensão da microbiota intestinal e seus efeitos sobre o hospedeiro (ZOETENDAL, et al., 2004; VAUGH, et al., 2005).

Microrganismos probióticos são fortemente associados a efeitos benéficos à saúde, a eles são atribuídos atividade antimicrobiana, redução do risco de doenças gastrointestinais, melhora no metabolismo da lactose, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas, efeito hipocolesterolêmico, propriedades anti-diarréicas, estimulação do sistema imunológico e melhora nas doenças inflamatórias intestinais (OUWEHAND; SALMINEN, 1998; GILL, et al., 2001; ISOLAURI, et al., 2004; SHAH, 2007; RANADHEERA, et al., 2010).

O longo histórico da utilização e dos efeitos de microrganismos probióticos ultrapassou a barreira especulativa e hoje há provas contundentes da ação destes microrganismos sobre o organismo onde eles se encontram. Neste cenário, os órgãos reguladores de substâncias e alimentos em todo o mundo se

ocupam da regulamentação e uso destes microrganismos. A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a WHO (World Health Organization) e no Brasil, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) definem probióticos como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao seu hospedeiro (FAO/WHO, 2001; ANVISA, 2008).

O equilíbrio da microbiota intestinal é o mais antigo benefício proposto a microrganismos probióticos (METCHNIKOFF (1905)). Este efeito tem sido amplamente estudado e é atualmente um dos parâmetros mais importantes nas alegações benéficas relacionadas a probióticos. A manutenção deste balanço no ecossistema do TGI é fortemente associado a um aumento de lactobacilos e/ ou bifidobactérias e uma diminuição de bactérias potencialmente patogênicas (JANKOVIC, et al., 2010). Nos últimos anos tem sido demonstrado que é possível modificar transitoriamente a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, em favor destas espécies após a ingestão de alguns probióticos (GOPAL, et al., 2003; ISOLAURI, et al., 2004; JANKOVICK, et al., 2010). Paralelamente, os métodos tradicionais de cultivo na avaliação destas intervenções, vêm sendo substituídos gradativamente por métodos com abordagens moleculares independentes de cultura.

Com o aumento do número de sequências genéticas disponibilizadas nas bases de dados GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology Information), um grande número de iniciadores específicos a gêneros e espécies têm sido desenvolvidos. Dentre os microrganismos probióticos lactobacilos e bifidobactérias são os principais alvos de investigação e métodos moleculares têm sido utilizados para estudo qualitativos e quantitativos destes microrganismos, bem como para avaliar os efeitos destes sobre o hospedeiro (VAUGH, et al., 2005; WALKER, et al., 2006; CAREY, et al., 2007; MASCO, et al., 2007; YUAN, et al., 2008; O'FLAHERTY, et al., 2010).

PCR em tempo real é uma ferramenta eficaz para estudos da composição da população microbiana em ambientes complexos como o trato gastrointestinal e permite a detecção e quantificação de organismos alvo. O desenvolvimento desta técnica tem propiciado um conhecimento mais aprofundado sobre a composição da microbiota intestinal, sua relação com a dieta, e seu papel na saúde e nas doenças. Deste modo constitui um instrumento útil para avaliação

clínica da eficácia dos probióticos (GUEIMONDE, et al, 2004; SMITH; OSBORN, 2009).

PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é atualmente a técnica mais sensível para a análise de alvos raros e permite em alguns casos, a detecção de uma única cópia de DNA alvo (PALMER, et al., 2003). A grande sensibilidade é uma vantagem crucial quando apenas pequenas quantidades de células ou tecidos são disponíveis ou níveis muito baixo do alvo são esperados (HOFSTÄTTER, et al., 2010). Como o método é muito sensível, algumas estratégias visando aperfeiçoar a obtenção de dados têm sido utilizadas. De forma que a utilização de um gene normalizador é sempre recomendado com o objetivo de contornar a variabilidade na extração de DNA e na amplificação. Entretanto, cuidados especiais como a sua estabilidade durante o tratamento experimental devem ser confirmadas (KUBISTA, et al., 2006; HOFSTÄTTER, et al., 2010; DAN; SUN 2011).

Nas aplicações de qPCR, tanto a quantificação absoluta quanto relativa são usadas. A abordagem relativa envolve um controle, uma amostra não tratada, dita amostra referência ou calibrador. Em geral o método é utilizado para analisar mudanças no perfil da expressão de um gene ou a relação de aumentos ou diminuição de um alvo em resposta a um tratamento, comparado a um nível basal (MARCELINO, 2009).

A aplicação bem sucedida e a precisão da qPCR depende de uma série de parâmetros técnicos envolvidos na amplificação e análise de dados, tais como qualidade do DNA e RNA, especificidade de iniciadores, a eficiência da PCR, e a seleção de fatores de normalização adequados (DAN; SUN, 2011).

O PCR quantitativo tem sido empregado com sucesso na quantificação de microrganismos probióticos, tanto em amostras de alimentos (MASCO, et al., 2007; KRAMER, et al., 2009) como no estudo da microbiota intestinal (GOPAL, et al., 2003; GUEIMONDE, et al., 2004; FUJIMOTO, et al., 2008).

Lactobacillus plantarum embora não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, é caracterizado como tal em muitos outros países; a esta espécie tem sido atribuído importantes incrementos na saúde do hospedeiro humano e animal (BUSKOWSKA, et al., 1997; NARUSZEWICZ, et al., 2002; YEN, et al., 2006; PAOLILLO, et al. 2009; HUGENSCHMIDT, et al., 2010). Por ter sido o primeiro genoma do gênero a ser sequenciado (KLEEREBEZEM, et al., 2003), muitas rotas metabólicas, mecanismos de regulação e a função de muitos genes

relacionados a espécie já foram exploradas. O acesso a estes dados viabilizam os estudos envolvendo a espécie e seu hospedeiro, pois facilita a troca de informações favorecendo a compreensão de muitos dos efeitos inerentes a *L. plantarum*.

Neste contexto, um leite fermentado contendo *L. plantarum* linhagem Lp115, foi introduzido na dieta de 61 indivíduos saudáveis e avaliou-se a quantidade do microrganismo nas fezes durante diferentes períodos de consumo bem como o período permanência pós consumo, utilizando qPCR, com avaliação dos dados por quantificação relativa com base em número de cópias do gene alvo/g fezes e Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g fezes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 RECRUTAMENTO E SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Em cumprimento às exigências da resolução 274/2005 da Universidade Estadual de Londrina, o comitê de ética na pesquisa envolvendo seres humanos (CEP-UEL), avaliou o projeto de pesquisas sob processo: 14995 / 2009, e designou parecer favorável à execução em 21/05/2009 (Anexo B: Formulários 1a, 1b, 3^a e 3b referentes à solicitação de autorização ao comitê de ética e, Anexo C: Parecer do comitê de ética).

Para seleção dos indivíduos a serem avaliados nesta pesquisa, a comunidade acadêmica recebeu convite para participação como voluntário. Em reunião pública, os voluntários receberam todos os esclarecimentos relacionados à pesquisa e 61 indivíduos adultos saudáveis, compostos por 19 homens e 38 mulheres, com idades entre 19 e 65 anos foram selecionados para compor o grupo de voluntários.

Visando monitorar o comportamento do microrganismo *L. plantarum* no trato gastrointestinal humano, os voluntários receberam doses diárias de 80 mL de leite fermentado contendo *L. plantarum* Lp115, com contagem regular na ordem de 10^{11} UFC/dose.

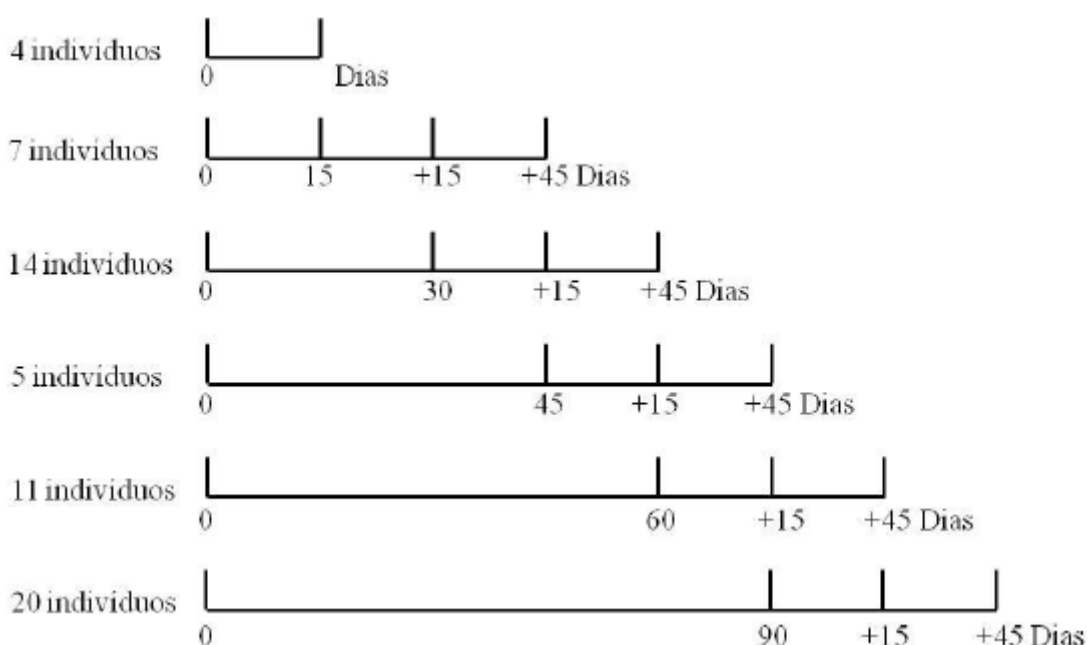
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente de forma que a cada 15 dias, um grupo, voluntariamente ou por sorteio deixasse de consumir o produto. Amostras fecais foram coletadas nos períodos determinados (Esquema1) e utilizadas para extração de DNA e posterior identificação e quantificação do microrganismo. O período anterior ao início da ingestão (Tempo 0) foi utilizado como linha de base. Foram avaliados cinco grupos com diferentes períodos de consumo e dois períodos pós consumo, 15 e 45 dias após a última ingestão.

2.3 AMOSTRAS FECAIS

Foram coletadas aproximadamente 5g de amostras fecais em frascos coletores esterilizados, nos períodos determinados de acordo com o esquema 1. As amostras coletadas foram imediatamente resfriadas e conduzidas ao laboratório. Cada amostra foi homogeneizada, fracionada em triplicatas em frascos (2 mL) e congeladas a -80°C até o momento de extração do DNA.

Esquema 1 – Número de indivíduos teste e períodos de amostragem em dias



2.4 LINHAGENS REFERÊNCIA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens referência, *L. plantarum* Lp115 (Danisco, Cotia-S.P, Brasil) avaliado como microrganismo alvo, cultivado por 12 horas em caldo MRS (de Man Rogosa e Sharpe - Oxoid, Cambridge, UK com sistema Anaerobac, Probac. São Paulo, Brasil) a 37°C em anaerobiose e *Bacillus thuringiensis* variedade *Thuringiensis* linhagem 407, usado como DNA endógeno ou normalizador, cultivado a 30°C, sob agitação até densidade óptica igual a 0,6 (D.O_{600 nm}) em caldo LB, composto por 10 g triptona (Himedia, Mumbai, Índia), 5 g extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia), 5 g NaCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e água destilada, quantidade suficiente para (q.s.p.) 1 L. O

cultivo de *B. thuringiensis* 407 foi centrifugado e a biomassa ressuspensa em solução salina 0,85% (p/v), adicionado de glicerol 50 % (v/v) (Synth, São Paulo, Brasil), alíquotado e congelado a -80°C para utilização como normalizador nas reações qPCR, bem como para avaliar a eficiência da extração de DNA.

2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS CULTURAS

O DNA genômico foi extraído de diluições seriadas das culturas de *L. plantarum* e *B. thuringiensis* com contagens variando de $2,4 \times 10^{11}$ a $2,4 \times 10^3$ e $4,3 \times 10^{11}$ a $4,3 \times 10^3$ UFC/mL, respectivamente. Foi utilizado o protocolo de GUEIMONDE e colaboradores com modificações (2004). Cada cultura foi centrifugada a 10.000 g por 5 min, o precipitado foi lavado duas vezes com tampão TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA pH 8,0) e ressuspensa em 200 µL de tampão TE (Reagentes Synth, São Paulo, BR).

A suspensão bacteriana foi submetida à fervura por 10 min e centrifugado a 10.000 g por 10 min. O DNA genômico contido no sobrenadante foi estocado a -20°C até o momento de uso.

2.6 EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS FECALIS

Para extração do DNA fecal foram utilizados 2 amostras de 200 mg de cada indivíduo em cada um dos períodos determinados (Esquema 1), totalizando 350 amostras.

Todas as extrações foram efetuadas com uso do mini Kit QIAamp® DNA Stool (Qiagen, Califórnia, USA), conforme instruções do fabricante. Após a adição do tampão de lise ASL (Qiagen, Califórnia, USA) à amostra, foi adicionado 10 µL de uma cultura de *Bacillus thuringiensis* linhagem 407 ($4,3 \times 10^4$ UFC/10 uL), cujo DNA foi utilizado como normalizador ou endógeno na análise de qPCR. A temperatura de lise aplicada foi 95°C/ 5 min. por se tratar de microrganismos Gram positivos. Após eluição em 200 µL de Tampão AE (Qiagen, Califórnia, USA) o DNA foi mantido a -20°C até o momento de uso.

2.7 OLIGONUCLEOTÍDEOS

Foram utilizados iniciadores LPrecAF e LPrecAR com 23 e 18 pb específicos para *L. plantarum* (COSTA, et al., 2011). Adicionalmente, a região do gene *recA* de *L. plantarum* utilizada para desenho dos iniciadores foi utilizada para seleção de uma sonda. Novos iniciadores e sondas com base em sequências nucleotídicas do gene *plcR* de *B. thuringiensis* disponíveis no banco de dados NCBI e uso do programa Primer Express 4.0 (Applied Biosystems, California, USA) foram selecionadas. Todos iniciadores e sondas foram sintetizados pela Applied Biosystems (São Paulo, Brasil). Para discriminação de *B. thuringiensis* foram selecionados duas sequências com 23 pares de bases, BTplcRF: TTTGTCCAATTTTTGAGCATGAA e BTplcRR: GTGCTTTCGTTACATTGGTCTT. As sondas AATGGGTGACGCACACGTTG com 20 pb marcada com FAM na extremidade 5' e MGB (Minor Groove Binder)[®] na extremidade 3' e AGCTTCTGTTGATAAAGGA com 19 pb marcada com VIC na extremidade 5' e MGB[®] na extremidade 3', conforme a tecnologia TaqMan[®] (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) intercalando os iniciadores de *L. plantarum* e *B. thuringiensis*, respectivamente.

2.8 CURVAS DE CALIBRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA

Para obtenção dos padrões de calibração e avaliação da eficiência do sistema qPCR, as linhagens de *L. plantarum* Lp115 e *B. thuringiensis* - 407, foram diluídas serialmente em água peptonada tamponada 0,1% (p/v) (Oxoid, Cambridge, UK) e plaqueadas em ágar MRS/48h e LB/12h respectivamente. As contagens bacterianas foram determinadas em UFC/mL.

A curva padrão baseada em UFC/reação foi obtida a partir do DNA genômico extraído das diluições em série (item 2.5) e foram utilizados em reações de PCR quantitativo. Os valores de Ct foram plotados em função de UFC/reação para cada uma das bactérias em análise (alvo e normalizador).

Para obtenção da curva padrão considerando o número de cópias do gene bacteriano, partiu-se de amostras de DNA com concentração =100 ng/uL, foram feitas diluições seriadas de razão 10, variando de 10⁸ a 1 cópia. A massa de

DNA genômico presente em cada diluição foi estimada com base no tamanho do genoma e seu peso molecular.

A determinação da massa de 1 cópia de cada genoma foi obtida conforme um dos modelos da equação abaixo, sabendo-se que *L. plantarum* e *B. thuringiensis* têm genomas com $3,2 \times 10^6$ pb e $5,2 \times 10^6$ pb respectivamente.

$$\begin{aligned}
 m &= n \text{ (pb)} \times \frac{1 \text{ mol}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas (pb)}} \times \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} \quad \text{OU} \quad \frac{3,2 \times 10^6 \text{ moléculas}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}} \times \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} \\
 m &= 3,2 \times 10^6 \text{ pb} \times \frac{660 \text{ g}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas (pb)}} \quad \text{OU} \quad m = \frac{2,11 \times 10^9 \text{ moléculas} \times \text{g}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}} \\
 m &= 3,2 \times 10^6 \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g} \quad \text{OU} \quad m = 3,506 \times 10^{-15} \text{ g OU } 3,506 \text{ femtogramas} \\
 m &= 3,506 \times 10^{-15} \text{ g OU } 3,506 \text{ femtogramas}
 \end{aligned}$$

Onde: N° Avogadro = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas, n = N° pb do genoma, 660 g/mol = valor estimado de um mol de pb, m = massa (g).

A eficiência de amplificação (E) e coeficiente de correlação (R^2) foram determinados a partir inclinação da reta (slope) oriunda das curvas padrões. O valor de E foi calculado pela equação: $E (\%) = [10^{(-1/\text{slope})}] \times 100$ (PFAFFL, 2001), utilizando uma série de diluições do DNA alvo e DNA do normalizador, com base em número de cópias do gene da bactéria, bem como em diluições das culturas bacterianas (UFC).

2.9 CONDIÇÕES DE REAÇÃO PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

Foram utilizados iniciadores e sondas para detecção do gene alvo e endógeno. A reação foi composta por 12,5 μ L de TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystem/Roche, New Jersey, USA); 0,4 umol de iniciadores BTplcR; 0,6 umol de iniciadores; 0,25 umol de cada sonda; 1,0 μ L de soro albumina bovina a 2,5 ug/ μ L (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); 5 μ L de DNA e água ultrapura (Teuto, Goiás, **Brasil**) q.s.p. 25 μ L volume final.

As reações qPCR foram conduzidas em aparelho ABI PRISM® 7300 Sequence detection system (Applied Biosystem, Califórnia, USA) com uso de

microplacas de PCR com 96 poços (Axygen, Califórnia, USA). O programa de amplificação consistiu de 50°C/2 minutos, 95°C/10 minutos, 40 ciclos de 95°C /15 segundos e 60°C /1 minuto. Em todas as reações foram utilizadas como controles positivo amostras de DNA de *L. plantarum* e *B. thuringiensis* e como controle negativo água ultra pura. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

2.10 QUANTIFICAÇÃO DE DADOS - qPCR

O método escolhido para análise quantitativa foi baseado na eficiência do sistema de amplificação qPCR, tanto para o gene alvo como para o gene normalizador. Para quantificação da bactéria alvo foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando quantidade conhecida de DNA de *B. thuringiensis* como normalizador, bem como um calibrador. Todos os tempos de análise (tratamentos) são calibrados ou relacionados a um experimento onde não houve tratamento, ou seja, o tempo zero.

A quantificação relativa (RQ) foi obtida a partir de curvas padrão com diluições seriadas do DNA das bactérias alvo e normalizador, bem como pela fórmula (PFAFFL, 2001):

$$QR = \frac{E^{\Delta CT \text{ alvo}}}{E^{\Delta CT \text{ normalizador}}}$$

Sabendo-se que: $ACT \text{ alvo} = [(CT \text{ calibrador}) - (CT \text{ alvo})]$

$ACT \text{ normalizador} = [(CT \text{ calibrador}) - (CT \text{ normalizador})]$

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a quantificação relativa baseado no número de cópias do genoma de *L. plantarum*/g fezes ou UFC/g fezes, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância com os dados transformados em $\text{Log}_{10}(X)$ para adequar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, a fim de avaliar a diferença entre as quantificações de acordo com os períodos de consumo

(0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias) e pós consumo (+15 e +45 dias). Utilizou-se o teste de Student-Newman-Keuls para comparações de médias quando o teste F da análise de variância foi significativo para o nível de significância de 5%.

A comparação entre os métodos quantificação relativa por fórmula (ACt), além de análise de dados com base em UFC/g fezes e N° cópias do gene/g fezes, foi avaliada através da correlação de Pearson para os dados transformados em $\text{Log}_{10}(X)$ para adequação do pressuposto de normalidade. As análises foram realizadas no programa Medcalc v.11.6 (Medcalc Software, Mariakerke, Bélgica).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E SUJEITOS DA PESQUISA

Este trabalho envolveu 61 voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos, cujas faixas etárias compreenderam 49.13 % de indivíduos com idades entre 17 - 25 anos, 33.33% com idades entre 26 - 35 anos, 10.53% entre 36 - 50 anos e 7.01% de indivíduos com idade superior a 50 anos. Não foram inseridas nenhuma modificação ou restrição na dieta dos indivíduos, apenas a introdução de uma dose diária de um leite fermentado contendo *L. plantarum* Lp115 e orientado para a não utilização de antibióticos durante a vigência da pesquisa ou a comunicação do uso dos mesmos aos coordenadores deste projeto.

Muitos efeitos benéficos são atribuídos a culturas bacterianas probióticas, entretanto, a grande maioria dos estudos tem sido baseados em populações humanas debilitadas, enquanto que a avaliação da manutenção destes microrganismos ou seus benefícios em populações saudáveis ainda é muito limitada (SAARELA, et al.; 2000; de VRESE, et al., 2006; LEYER, et al., 2009).

Embora se saiba que a microbiota intestinal ao longo da vida adulta seja relativamente estável e varie de acordo com os hábitos e habitat a que cada indivíduo está exposto (ISOLAURI, et al., 2004; TIIHONEN, et al., 2010), a importância da persistência destes microrganismos no TGI é questionada, uma vez que a microbiota alóctone também pode melhorar e aumentar as funções benéficas no TGI e por consequência, no hospedeiro (SAARELA, et al., 2000). A abordagem nesta investigação foi justamente avaliar o comportamento do *Lactobacillus plantarum* Lp115 e sua permanência na microbiota fecal de uma população adulta saudável durante e após o consumo de um leite fermentado contendo este microrganismo.

3.2 ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

A especificidade dos iniciadores foi avaliada em reações de PCR convencional e em tempo real. Em ambos os sistemas, ocorre amplificação tanto para o gene alvo como para o gene normalizador apenas quando há a presença do DNA de *L. plantarum* Lp115 e/ou *B. thuringiensis* - Bt407, na PCR. Isso fica muito

claramente evidenciado quando utilizamos na reação, DNAs oriundos de amostras fecais de um indivíduo controle, sem tratamento ou sem adição do DNA normalizador (Bt407) e observamos ausência de sinal para ambos os genes. Adicionalmente, a especificidade dos iniciadores para o gene *recA* aqui relacionado ao lactobacilo Lp115, foi confirmada em um trabalho recentemente publicado (COSTA, et al., 2011).

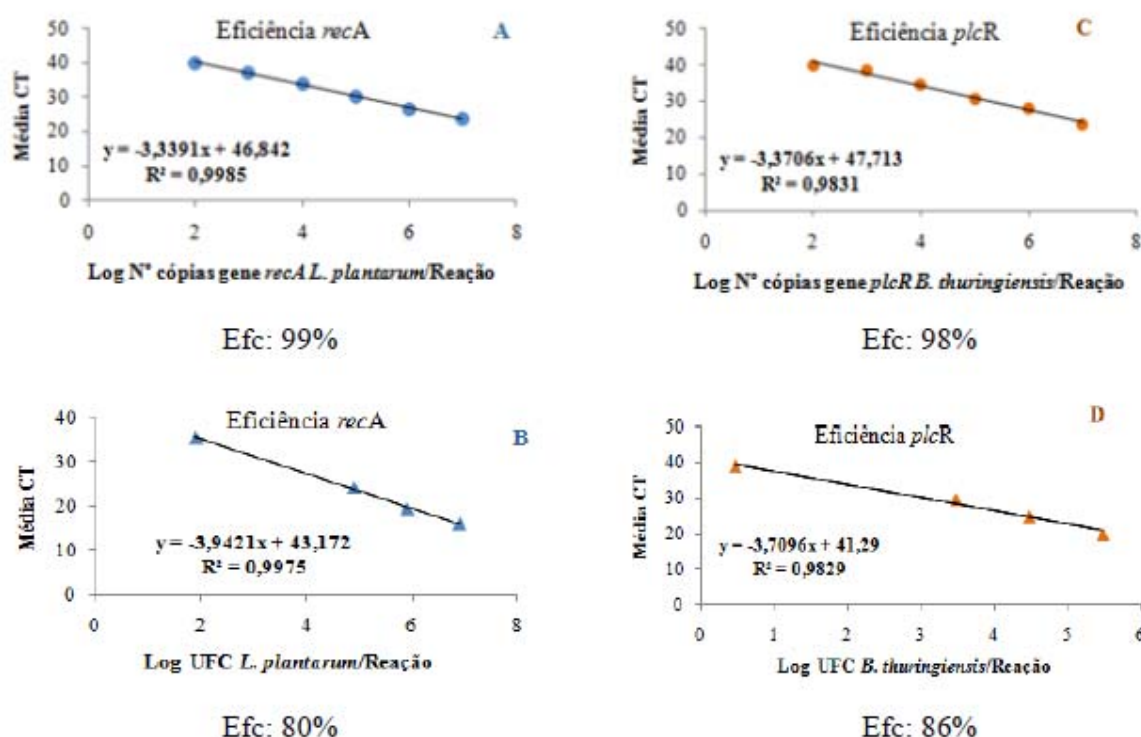
A opção pelo sistema TaqMan® nos permite maior especificidade e reprodutibilidade (WITTEWER, et al., 1997; KUBISTA, et al., 2006; HOFSTÄTTER, et al., 2010) e permite a quantificação do gene alvo e normalizador numa mesma reação. Além disso, o uso de sondas com o fluoróforo quencher MGB (Minor Groove Binding), permite aumentar a temperatura de '*melting*' da sonda sem aumentar seu tamanho. Isso aumenta a especificidade e sensibilidade do método (HAARMAN; KNOL, 2006).

3.3 EFICIÊNCIA DO SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO QPCR

As eficiências dos sistemas de amplificação foram de 99 e 98% para os genes *recA* e *plcR* respectivamente, com utilização de diluições seriadas com base em quantidade de cópias do gene. Além disso, foram obtidas eficiências de 80 e 86% para os genes *recA* e *plcR* a partir de diluições seriadas das culturas Lp115 e Bt407, respectivamente (Fig.1). Os coeficientes de correlação (R^2) em todas as eficiências são superiores a 0,98 indicando o nível de correlação entre os valores de Ct e o Log do N° de cópias ou Ct e Log₁₀ de UFC/ reação.

Em quaisquer dos modelos usados (N° de cópias ou UFC) e para ambos os genes, observou-se valores de inclinação da reta entre -3,33 a -3,94. A inclinação da reta permite estimar os valores das eficiências de amplificação da PCR, um valor de -3,32 indica uma eficiência de amplificação teórica de 100% (GINZINGER, 2002). Também, é desejado que eficiências tanto do gene alvo como do normalizador sejam próximas (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; LU, et al., 2010) e isso ocorre nos dois sistemas. As diferenças entre gene alvo e endógeno quando se utiliza curvas padrão baseado em quantidade cópias dos genes ou quantidade de UFC é de 1 e 6% respectivamente, indicando que os sistemas estão adequados.

Figura 1 – Determinação das eficiências do sistema multiplex para o gene alvo (*recA*) e para o gene normalizador (*plcR*). As amostras do DNA genômico de *L. plantarum* (A) e *B. thuringiensis* (C) diluídas serialmente, foram detectadas num intervalo de 10.000.000 a 100 cópias do gene/reacção ou amostras de diluições das culturas cuja detecção ocorreu para contagens em placa no intervalo de 8×10^7 a 80 UFC de *L. plantarum*/reacção (B) e de 3×10^5 a 30 UFC de *B. thuringiensis*/reacção (D). Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição, e eficiências calculadas com base na fórmula $E (\%) = [10^{(-1/\text{slope})}] \times 100$



A metodologia qPCR tem sido amplamente aplicada em quantificação de probióticos, tanto em produtos como em estudos clínicos. Em geral a quantificação absoluta com utilização de curvas padrão dadas em UFC/mL é mais utilizada (GOPAL, et al., 2003; GUEIMONDE, et al, 2004; FUJFMOTO, et al. 2008; MATLTASIC, et al., 2010), embora, muitos destes estudos não utilizem controles internos (normalizadores) ou não apresentem a eficiência do sistema qPCR, o que pode levar a obtenção de dados super ou subestimados.

A adição de uma quantidade conhecida de células ($4,3 \times 10^4$ UFC/10 μ L) de *B. thuringiensis* ao material fecal como DNA normalizador e detecção na ordem de 10^3 /reacção, nos permitiu validar a eficiência do método, além de comprovar a alta capacidade de recuperação de DNA pelo método de extração

usado. FUJIMOTO e colaboradores (2008) utilizaram o mesmo procedimento e também demonstraram alta capacidade de recuperação de *L. casei* adicionado a amostras fecais e avaliados por qPCR. Além disso, a etapa de normalização tem por base a prevenção da ocorrência de falsos positivos ou negativos na reação. Isso é altamente recomendado devido a alta sensibilidade da metodologia PCR em tempo real (HOFSTÄTTER, et al., 2010)

A otimização do sistema qPCR com eficiências adequadas para os sistemas envolvidos, levou a obtenção de limites de detecção para *L. plantarum* e *B. thuringiensis* de 8×10^1 UFC/reação e 3×10^1 UFC/reação respectivamente, além de 1000 cópias do gene *recA* e *plcR*.

3.4 DETECÇÃO QUANTITATIVA DE *L. PLANTARUM* EM AMOSTRAS FECALIS

Neste estudo foi adotada a quantificação relativa por ser um método que demonstra quanto do microrganismo probiótico introduzido na dieta é observado com relação ao nível basal (tempo zero) ao longo de diferentes períodos de ingestão e após a interrupção do consumo.

O *L. plantarum* foi detectado nas amostras de todos os indivíduos em todos os períodos de ingestão do probiótico. Para confirmação ou exclusão da presença de *L. plantarum* na população teste, as amostras relativas ao tempo zero de todos os 61 indivíduos foram avaliadas, e verificou-se que a detecção do alvo ocorreu em amostras de apenas dois indivíduos, um indicativo de que em geral o microrganismo não faz parte da microbiota fecal desta população. Isso demonstra também a não ocorrência de reação cruzada com outras espécies geneticamente similares a *L. plantarum* que possam estar presentes na microbiota fecal autóctone. Embora *L. plantarum* não seja o lactobacilo mais comumente relatado como integrante da microbiota fecal humana, a sua ocorrência é reportada em investigações com abordagens fenotípicas e genotípicas (MOLIN, et al., 1993; ADLERBERTH, et al., 1996; WANG, et al., 2010; DHANANI, et al., 2011).

A quantificação de *L. plantarum* em amostras do mesmo indivíduo ocorreu em níveis muito similares, com baixo coeficiente de variação, entretanto, entre indivíduos a variação é muito ampla. Isso pode ser relacionado às características únicas de cada voluntário e a sua microbiota é determinada por uma

interação entre fatores genéticos, sua dieta, secreção de muco e enzimas digestivas e o peristaltismo intestinal (LEY, et al., 2006).

Na tabela 1 observa-se as médias geométricas obtidas para os seis grupos de indivíduos nos diferentes tempos de análise, para efeito de avaliação estatística os grupos foram tratados independentemente como prevê o método. Os dados se referem a quanto do microrganismo alvo é observado em cada grupo, com relação ao tempo zero (Grupo 1) onde não houve tratamento. A quantidade máxima de *L. plantarum* observada ocorreu aos 15 dias de ingestão, tanto na análise baseado em N° de cópias quanto em UFC/g fezes.

Todas as médias obtidas em cada período de consumo com relação ao tempo zero são significativas ($P=0,001$). A comparação entre os tempos de consumo do probiótico, evidenciam que há diferença significativa ($P= 0,001$) entre as médias dos grupos 2 e 3 que consumiram o leite fermentado por 15 e 30 dias, entre os demais tempos analisados não há diferença significativa entre grupos (Fig 2 A e B). Entretanto com a descontinuidade da ingestão, os valores caem bruscamente e não são significativamente diferentes com relação à linha de base (Tab. 1). Observando os dados da análise qPCR, a detecção nos tempos pós consumo para todos os grupos voltam à faixa de não detecção, similar ao tempo zero.

Outros estudos com abordagens análogas envolvendo *Lactobacillus* relatam um comportamento similar para as espécies *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* DR20, *L. helveticus* GCL1001 e *L. casei* Shirota (SHEEN, et al., 1995; TANNOCK, et al., 2000; SAITO, et al., 2004; FUJIMOTO, et al., 2008). Os dados obtidos nesta investigação reforçam os argumentos de que probióticos não persistem de forma permanente no trato digestivo, quando a ingestão é interrompida (SAARELA, et al., 2000; HEYMAN; MÉNARD, 2002).

Muitos autores afirmam que a permanência ou colonização do TGI, é espécie e até linhagem dependente, e que a colonização efetiva ocorre mais facilmente em neonatos (LANGHENDRIES, et al., 1995; HEYMAN; MÉNARD, 2002, ISOLAURI, et al., 2004; HAARMAN; KNOL, 2006), cuja microbiota do TGI ainda não está completamente formada. Já a microbiota intestinal em adultos saudáveis parece ser estável e bem definida no nível de gênero e até mesmo de espécie. No nível de linhagem, no entanto, uma variação considerável na composição da microbiota fecal tem sido observada e os componentes da dieta podem influenciar esta variação (ISOLAURI, et al., 2004; SANTOSA, et al., 2006).

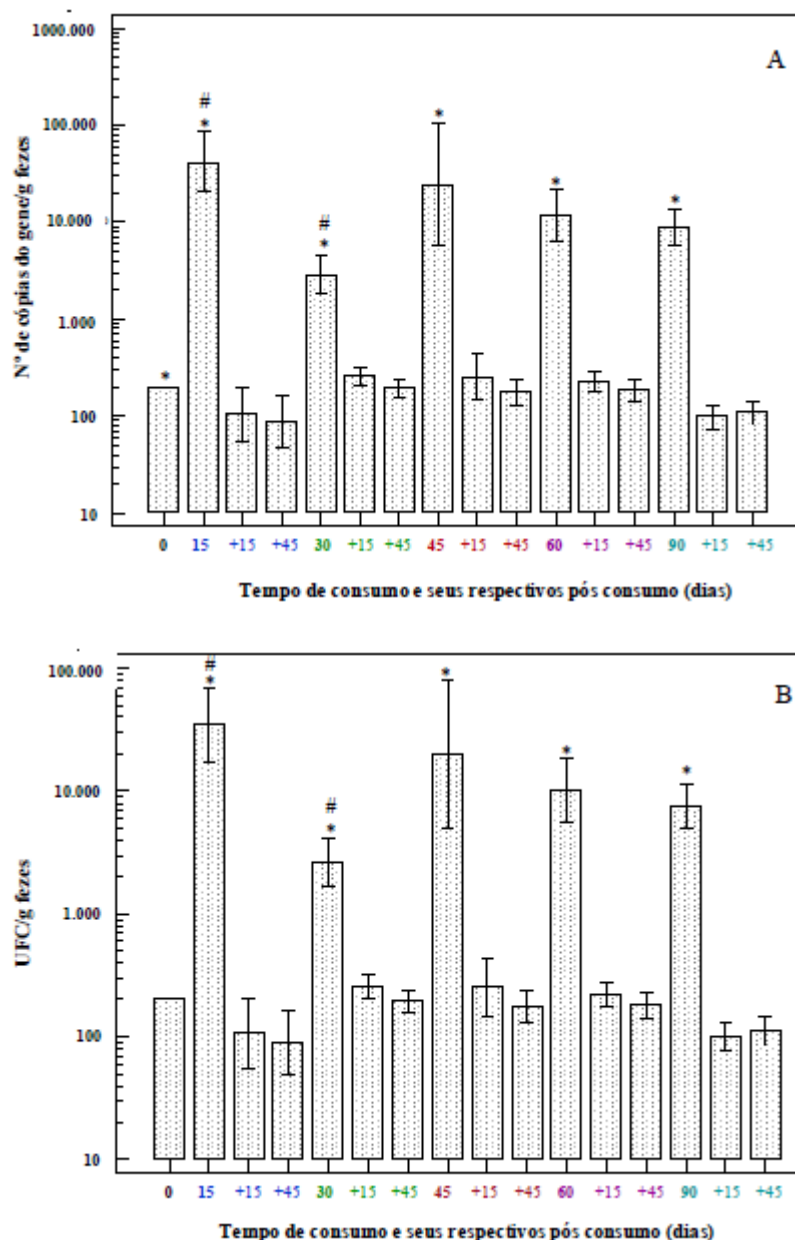
Além disso, diversos outros trabalhos demonstram que para microrganismos probióticos, não há necessidade de colonização para ocorrência de efeitos benéficos, a persistência temporária como microbiota alóctone por si só pode promover efeitos benéficos à saúde (SAARELA, 2000, ISOLAURI, et al., 2004).

Os resultados evidenciam que o aumento do período de ingestão do *L. plantarum*, não aumentou os seus níveis de detecção na microbiota fecal. Nas duas abordagens, uma tendência geral observada foi de um maior nível de detecção de *L. plantarum* nas fezes com menor tempo de ingestão, exceto no grupo que consumiu o probiótico durante 30 dias com relação aos demais tempos de consumo (Fig 2 A e B) . Considerando que tanto o gene alvo como o normalizador são cópia única no genoma do microrganismo, a relação de similaridade entre as duas quantificações é coerente.

Tabela 1 – Médias geométricas da quantificação relativa ACT transformados em massa de amostra fecal (g) dos seis grupos de indivíduos, durante diferentes tempos de ingestão e após ingestão de *L. plantarum*

Grupos	Tempo de consumo (dias)	Nº de indivíduos	Média geométrica *(Nº cópias do gene/g fezes)	Média geométrica *(UFC/g fezes)
G1	0	4	200	200
	15	7	41.720	34.820
G2	+15	7	104	106
	+45	7	88	89
G3	30	14	2.874	2.610
	+15	14	256	254
	+45	14	196	193
G4	45	5	24.080	20.168
	+15	5	254	253
	+45	5	175	175
G5	60	11	11.746	10.134
	+15	11	224	223
	+45	11	182	183
G6	90	20	8.834	7.648
	+15	20	99	100
	+45	20	110	111

Figura 2 – Gráfico com valores médios da quantificação relativa ao tempo zero: **(A)** baseado em eficiências curva padrão com N° de cópias do gene *recA/g* fezes **(B)** baseado em curva padrão em UFC/g fezes nos períodos de consumo: 15, 30, 45, 60 e 90 dias seguido pelos seus respectivos tempos pós consumo +15 e +45 dias. A quantificação é dada em médias e relacionada ao tempo zero. *, Representam as médias com diferença significativa (P= 0,001) com relação ao tempo zero. #, Representam as médias com diferença significativa entre si. As barras representam erro padrão



A quantidade diária de microrganismo ingerido, 2×10^{11} UFC/dose, é muito superior à faixa de detecção observada, em torno de 10^4 UFC/g de fezes, enquanto os indivíduos estão ingerindo o probiótico, entretanto, a ocorrência ou não

de colonização do TGI não pode ser comprovada via microbiota fecal. A amostra fecal é o material mais facilmente disponível para investigação da microbiota intestinal, embora se questione o quão bem os microrganismos fecais representem esta população, uma vez que a microbiota varia ao longo de todo TGI (ISOLAURI, et al., 2004). É evidente que para informações mais precisas sobre a microbiota do TGI, as amostras adequadas deveriam ser tomadas durante endoscopias ou processos cirúrgicos, o que torna o acesso bastante invasivo e, portanto, desaconselhado e pouco utilizado em pesquisas. Além disso, a falta de informações sobre os efeitos de anestésicos e produtos de assepsia utilizados nestes procedimentos podem comprometer a investigação (ISOLAURI, et al., 2004; LEY, et al., 2006).

Por outro lado, a colonização do TGI é fortemente associada à capacidade de adesão à mucosa intestinal e adesinas específicas são comumente relatadas para *L. plantarum* (SANCHEZ, et al., 2008). A capacidade de adesão a receptores específicos presentes na mucosa intestinal, como adesinas manose específicas (Msa) (ADLERBERTH, et al., 1996; PRETZER, et al., 2005) ou a componentes epiteliais como mucinas do cólon humano são atribuídas a linhagens de *L. planarum* (KINOSHITA, et al., 2008; ANDERSON, et al., 2010).

Daniel e colaboradores (2006), utilizaram a linhagem *L. plantarum* Lp115 em uma investigação relacionada à segurança e funcionalidade da linhagem em modelo animal e *in vitro*. Os autores observaram que a linhagem apresentou perfil de segurança adequado e alto nível de sobrevivência às condições do TGI. A administração intra gástrica de 10^{10} UFC da linhagem Lp115, levou à recuperação 10 UFC/100 mg de fezes, durante o período de consumo, além disso, o microrganismo foi recuperado em até 13 dias após interrupção do tratamento na ordem de 10^3 - 10^2 UFC/100 mg de fezes.

Nesta investigação, para análise de dados qPCR, foram utilizados diferentes abordagens e observou-se que independente do método, tanto a quantificação absoluta ou relativa com curvas ou fórmulas há uma mesma tendência. A amplitude numérica dos dados e a variabilidade inerente ao método mudam, mas os dados nos conduzem à mesma conclusão biológica.

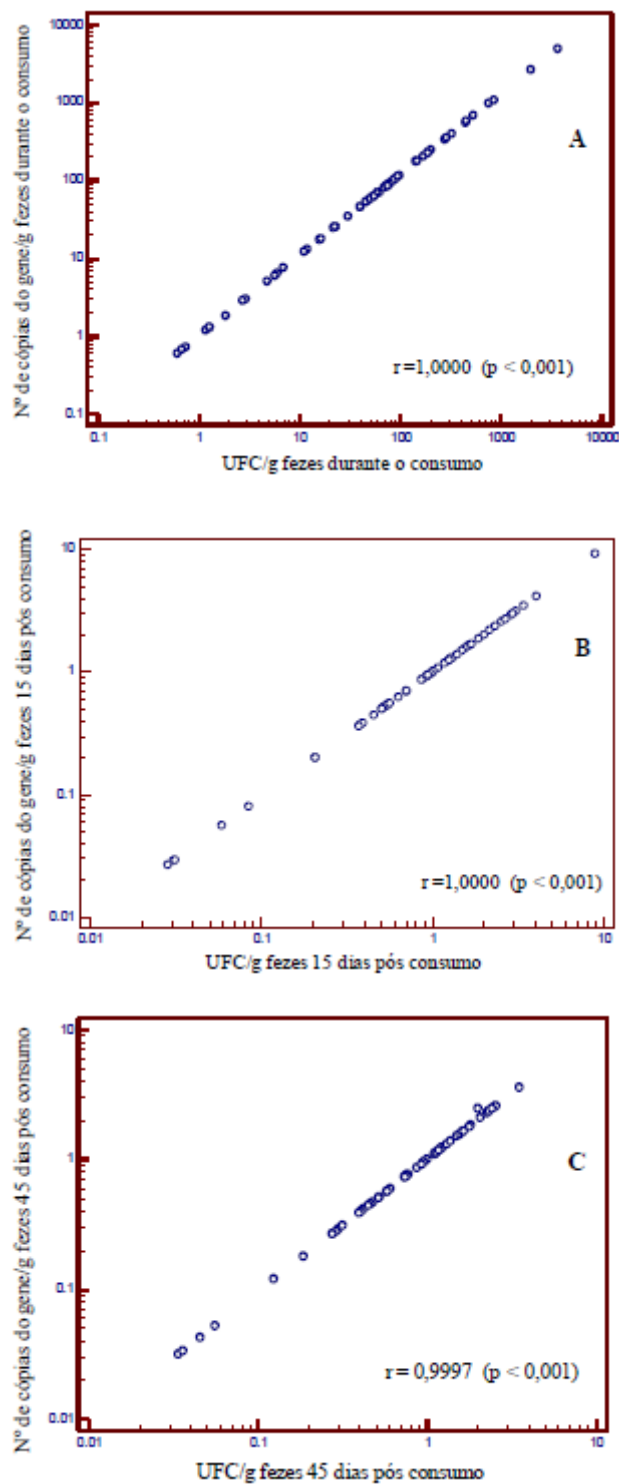
Uma avaliação dos dados correlacionando o comportamento da espécie *L. plantarum* ao sexo da população envolvida não demonstrou distinção de comportamento entre grupos (dados não mostrados). SGHIR e colaboradores,

(2000) investigaram a estrutura populacional dos grupos filogenéticos predominantes na microbiota fecal humana de adultos saudáveis e concluíram que não há diferenças marcantes entre homens e mulheres.

3.5 QUANTIFICAÇÃO COM BASE EM NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE ALVO OU CONTAGEM (UFC) DA BACTÉRIA ALVO

As correlações entre os dois métodos de análise permitem afirmar que ambas as abordagens podem ser utilizadas com alto grau de correlação para quantificação relativa. A relação entre as duas formas de análise, tanto durante o consumo (Fig. 3A) como para o pós consumo (Fig. 3B e C) apresentam o mesmo padrão de comportamento, ou seja uma correlação positiva (= 1,00 com valor de $p < 0,0001$)

Figura 3 – Correlações entre as quantidades de *L. plantarum*, obtidas por dados em N° de cópias do gene alvo/g fezes x UFC de *L. plantarum*/g fezes. **(A)** durante o período de consumo, **(B)** 15 dias após a interrupção do consumo e, **(C)** 45 dias após a interrupção do consumo de leite fermentado contendo a linhagem Lp115



A abordagem pelo método de quantificação relativa pela fórmula (ACT) com eficiências obtidas através de curvas padrão baseado em número de cópias do gene *recA*/reação ou UFC/reação, mostraram o mesmo comportamento. Embora a extração de DNA da cultura e determinação da contagem microbiana possam introduzir fontes de erros na análise, isso não foi observado nos dados obtidos.

4 CONCLUSÃO

O método qPCR utilizado neste estudo foi eficiente, seletivo e apresentou alta reprodutibilidade na quantificação de *L. plantarum* em amostras fecais humanas. A comparação da análise de dados com base em N° de cópias do gene alvo e UFC da bactéria, evidenciou coerência entre as abordagens. Isto resultou do desenvolvimento de iniciadores e sondas adequados, do uso de normalizador, bem como da otimização do sistema qPCR e da análise de dados com o uso de ferramentas estatísticas coerentes com os objetivos propostos.

A introdução de espécies ou linhagens bacterianas potencialmente benéficas, na dieta alimentar e a avaliação dos seus efeitos é o caminho mais adequado para confirmação de alegações funcionais. Os dados deste trabalho demonstraram a ocorrência de *L. Plantarum* Lp115 na microbiota fecal durante o período de consumo do leite fermentado. Entretanto, a detecção em amostra fecal não é suficiente para demonstrar a ocorrência de colonização.

Apesar disso, a ingestão de *L. plantarum* Lp115 e sua presença como microbiota alóctone, pode ser suficiente para alterar o balanço microbiano no TGI favorecendo o aumento de microrganismos benéficos em detrimento de espécies patogênicas. Estudos complementares permitirão demonstrar os efeitos de *L. plantarum* Lp115 no hospedeiro, bem como a sua importância como microrganismo probiótico.

5 REFERENCIAS

- ADLERBERTH, I.; AHRNÉ, S.; JOHANSSON, M. L.; MOLIN, G.; HANSON and , L. A.; WOLD, A. E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7): 2244-2251.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005, atualizada em Julho de 2008. Legislação para alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 dez. 2010.
- ANDERSON, R. C.; COOKSON, A. L.; MCNABB, W. C.; KELLY, W. J. and. ROY, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* DSM2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*, 309: 184-192.
- BUKOWSKA, H.; PIECZUL-MRÓZ, J.; ASTRZÊBSKA, M., CHELSTOWSKI, K. and NARUSZEWICZ, M. (1997). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137, 437-438.
- CAREY, C. M.; KIRK, J. L.; OJHA, S. and KOSTRZYNSKA, M. (2007). Current and future uses of real time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 537-550.
- COSTA, G. N.; VILLAS-BÔAS, G. T.; VILLAS-BOAS, L. A. and MIGLIORANZA, L. H. S. (2011). *in silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples. *European Food Research Technology*, in press.
- DANG, W. and SUN, L. (2011). Determination of internal controls for quantitative real time RT-PCR analysis of the effect of *Edwardsiella tarda* infection on gene expression in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 720-728.
- DANIEL, C.; POIRET, S.; GOUDERCOURT, D.; DENNIN, V.; LEYER, G. and POT, B. (2006). Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9): 5799- 5805.
- de VRESE, M.; WINKLER, P.; RAUTENBERG, P.; HARDER, T.; NOAH, C.; LAUE, C.; OTT, S.; HAMPE, J.; SCHREIBER, S.; HELLER, K.; SCHREZENMEIR, J. (2006). Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. *Vaccine*, 24:6670-6674.
- DHANANI, A. S.; GAUDANA, S. B.; BAGCHI, T. (2011). The ability of *Lactobacillus* adhesin EF-Tu to interfere with pathogen adhesion. *European Food Research Technology*, 232: 777-785.

- FAO - Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.
- FUJIMOTO, J.; MATSUKI, T.; SASAMOTO, M.; TOMII, Y. and WATANABE, K. (2008). Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. *International Journal of Food Microbiology*, 126:210-215.
- GILL, H. S.; DARRAGH, A.J. and CROSS, M. L. (2001). Optimizing immunity and gut function in the elderly. *The Journal of Nutrition Health & Aging*, 5 (2): 80-91.
- GINZINGER D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative pcr: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- GOPAL, P. K.; PRASAD, J. and GILL, H. S. (2003). Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10™) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in the human subjects. *Nutrition Research*, 23: 1313 - 1228.
- GUEIMONDE, M., TOLKKO, S., KORPIMKI, T. and SALMINEN, S., (2004). New Real-Time Quantitative PCR procedure for quantification of Bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 10, 4165-4169.
- HAARMAN, M. and KNOL, J. (2006). Quantitative real-time pcr assays to identify and quantify fecal *bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (4): 2359-2365.
- HEYMAN, M. and MENARD, S. (2002). Probiotic microorganisms: How they affect intestinal the pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 1151 - 1165
- HOFSTÄTTER H. B.; TSCHERNUTTER M. and KUNERT, R. (2010). Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 87:419-425.
- HUGENSCHMIDT, S.; SCHWENNINGER S. M.; GNEHM, N.; LACROIX, C. (2010). Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* 20, 852 - 857.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; and OUWEHAND, A.C. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2): .299-313.
- JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E. and MERCENIER, A. (2010). Application of probiotics in food products - Challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 175-181.
- KINOSHITA, H.; UCHIDA, H.; KAWAI, Y.; KAWASAKI, T.; WAKAHARA, N.; MATSUO, H.; WATANABE, M.; KITAZAWA, H.; OHNUMA, S.; MIURA, K.; HORII, A.; SAITO, T. (2008) Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1667-1674.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S.A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M.; BRON, P. A.; HOFFER S. M.; GROOT, M. N.; KERKHOVEN, R.; de Vries, M.; URSING, B.; de VOS, W. M.; SIEZEN, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1990 -1995.

KRAMER, M.; OBERMAJER, N.; MATIJASIC, B.B.; ROGELJ, I. and KMETEC, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:1137-1147.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.

LANGHENDRIES, J. P.; DETRY, J.; VAN HEES, J.; LAMBORAY, J. M.; DARIMONT, J.; MOZIN, M. J.; SECRETIN, M. C.; SENTERRE, J. (1995) Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 21: 177-181.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A. and GORDON, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124: 837-848.

LEYER G. J.; LI, S.; MUBASHER, M. E.; REIFER C.; OUWEHAND, A.C. (2009). Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics*, 124: 172-179.

LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402- 408.

LU, S.; SMITH, A.P.; MOORE, D. and LEE, N.M. 2010. Different real-time PCR systems yield different gene expression values. *Molecular and Cellular Probes* 24: 315 -320.

MARCELINO, F. C. (2009). PCR quantitativo em tempo real: Metodologias e aplicações. *Curso: Embrapa Soja, Londrina*. pg 1-29.

MASCO, L.; VANHOUTTE, L.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. and HUYS, G. (2007). Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 113 : 351 - 357.

MATIJASIC, B. B.; OBERMAJER T. and ROGELJ, I. (2010). Quantification of *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. *Food Control*, 21: 419 - 425.

METCHNIKOFF, E. (1905). Immunity in infective diseases. Cambridge University Press, New York.

MOLIN, G., B. JEPPSON, M.-L. JOHANSSON, S. AHRNE', S. NOBAEK, M. STÅHL, and S. BENGMARK. 1993. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3):314-323.

NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M. L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D. and BUKOWSKA, H. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1249 - 1255.

O'FLAHERTY, S.; GOH, Y.J. and KLAENHAMMER, T.R. (2009). Genomics of probiotic bacteria, In: Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Charalampopoulos, D.; Rastall, R.A (Eds). 1st Ed. Springer-Verlag New York INC, New York, 1265p.

OUWEHAND A. C. and SALMINEN, S.J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8:749 - 758.

PALMER, S.; WIEGAND, A.; MALDARELLI, F.; BAZMI, H.; MICAN, J.; POLIS, M.; DEWAR, R.; PLANTA, A.; LIU, S.; METCALF, J.; MELLORS, J. and COFFIN, J. (2003). New real-time

reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:4531-4536.

PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; SORRENTINO, S.; MAZZOLA, N. and RIZZO, A. (2009). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *International Immunopharmacology* 9, 1265 - 1271.

PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002-2007.

PRETZER, G.; SNEL, J.; MOLENAAR, D.; WIERSMA, A.; BRON, P. A.; LAMBERT, J.; de VOS, W. M.; van der MEER, R.; SMITS, M. A. and KLEEREBEZEM, M. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 187: 6128 - 6136.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K. and ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43: 1-7.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R. MATTO, J.;MATTILA-SANDHOLM, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197215.

- SAITO, Y.; SAKAMOTO, M.; TAKIZAWA, S.; BENNO, S. (2004). Monitoring the cell number and viability of *Lactobacillus helveticus* GCL1001 in human feces by PCR methods. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 125 -130.
- SANCHEZ, B.; BRESSOLIER P. and URDACI, M. (2008). Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54: 1-17.
- SANTOSA, S.; FARNWORTH, E.; JONES, P.J.H. (2006). Probiotics and their potential health claims. *Nutrition Reviews*, 64 (6): 265-274.
- SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAU, A.; ROCHET, V. POCHART, P. and DORE, J. (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 2263 -2266.
- SHAH, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International of Dairy Journal*, 17:1262-1277.
- SHEEN, P.; OBERHELMAN, R.A.; GILMAN, R.H.; CABRERA, L.; VERASTEGUI, M. and MADICO, G. (1995). Short report: a placebo controlled study of *Lactobacillus GG* colonization in one-to three- year-old Peruvian children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52:389 -392.
- SMITH, C. J. and OSBORN, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology and Ecology*, 67: 6 - 20. TANNOCK, G. W.; MUNRO, K.; HARMSEN, H. J. M.; WELLING, G. W.; SMART, J. and GOPAL, P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6): 2578-2588
- TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; and RAUTONEN, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9:107-116.
- VAUGHAN, E. E.; HEILIG, H. G. H. J.; BEN-AMOR, K. and de VOS, W.M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 477- 490.
- WALKER, W. A.; GOULET, O.; MORELLI, L. O. and ANTOINE, J. M. (2006). Progress in the science of probiotics. *European Journal of Nutrition*, 45, (Suppl 1): 1-18.
- WANG, C. Y.; LIN, P. R.; NG, C. C.; SHYU, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16: 578-585.
- WITTEWER, C. T., HERRMANN, M.G., MOSS, A. A., RASMUSSEN, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130 -138.
- YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHEK, M. A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.;

BLUMENSCHNEIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A. and RENNICK, D., (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of Clinical Investigation* 116,1310 - 1316.

YUAN, J.; WANG, B.; SUN, Z.; BO, X.; YUAN, X.; HE, X.; HE, X.; ZHAO, H.; DU, X.; WANG, F.; JIANG, Z.; ZHANG, L.; JIA, L.; WANG, Y.; WEI, K.; WANG, J.; ZHANG, X.; SUN, Y.; HUANG, L. and ZENG, M. (2008). Analysis of hostinducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in vivo. *Journal of Proteome Research*, 7: 375-385.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M. and de VOS, W.M. (2008). High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57(11): 1605- 1615.

ZOETENDAL, E. G.; COLLIER, CT.; KOIKE, S.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I. and GASKINS, H. R. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *The Journal of Nutrition*, 134: 465-472.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Neste estudo, o uso em conjunto de ferramentas moleculares como bioinformática, PCR convencional e em tempo real, propiciou a discriminação da espécie *L. plantarum* de espécies filogeneticamente relacionadas, tanto em amostras de alimentos como em amostras fecais humanas.

➤ O estudo das relações filogenéticas *in silico* de BAL e enterobactérias com base no gene *recA*, evidenciou grupos distintos entre estes microrganismos, discriminando grupos de BAL estreitamente relacionadas, entre eles as espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*;

➤ A seleção de iniciadores espécie-específicos possibilitou a detecção exclusiva da espécie *L. plantarum*, diferenciando-o de espécies relacionadas comuns em alimentos;

➤ Os níveis de detecção da espécie, na reação foram de 1×10^3 UFC/mL para amostras de alimentos, e 7×10 UFC/mL em meio de cultura;

➤ O leite fermentado produzido com *L. plantarum* Lp115 apresentou alta viabilidade do lactobacilo, e se manteve estável microbiológica e físico-quimicamente, durante 90 dias armazenado sob refrigeração (± 10 °C);

➤ O *L. plantarum* foi detectado e quantificado na microbiota fecal de todos os indivíduos durante todo o período de consumo do leite fermentado; sendo que o nível máximo de detecção esteve na ordem de 10^4 UFC/g fezes.

Os resultados apresentados evidenciam a potencialidade do uso de ferramentas moleculares para estudos de probióticos e suas interações com a microbiota intestinal. e podem ser utilizados para o monitoramento de *L. plantarum* em alimentos ou amostras complexas como o TGI humano ou animal.

Além disso, embora o microrganismo não tenha sido observado na microbiota fecal após interrupção da dieta, a sua presença no TGI como microbiota alóctone pode alterar o balanço microbiano, o que pode favorecer o aumento de microrganismos benéficos em detrimento de patógenos. O material utilizado nesta investigação pode ser utilizado em futuros estudos com este foco.

ANEXOS

ANEXO A

Author's personal copy

Eur Food Res Technol
DOI 10.1007/s00217-011-1508-7

ORIGINAL PAPER

***In silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples**Giselle Nobre Costa · Gislayne T. Vilas-Bôas ·
Laurival A. Vilas-Boas · Lúcia H. S. MiglioranzaReceived: 16 March 2011 / Revised: 11 May 2011 / Accepted: 22 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Lactic acid bacteria (LAB) include species very closely related both physiologically and genotypically. Therefore, the identification of this bacteria group using conventional phenotypic methods is ambiguous and cumbersome. In this study, we have analyzed a *recA* gene fragment from 30 bacteria, including LAB and species common in the human gastrointestinal tract, aiming to evaluate the gene conservation among them and the development of primers and PCR conditions able to discriminate *Lactobacillus plantarum* strains from LAB closely related. The fragment with 995 bp of *recA* gene has grouped LAB, enterobacteria and bifidobacteria, in different clusters. A novel primer pair, LPrecAF and LPrecAR with 23 and 18 bp, respectively, has allowed the single amplification of a 108 bp fragment of *L. plantarum* strains contained in culture broth and fermented dairy samples. The observed detection limit for food samples and for cultures broth were 1×10^3 and 7×10^2 CFU mL⁻¹, respectively. This approach proved to be a simple and efficient method for the identification and monitoring of *L. plantarum* in food,

feeds, and culture broth. Moreover, the assay could be used in the studies from human or environmental microbiota.

Keywords PCR assay · LAB · *RecA* · Food sample · Neighbor-joining model

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB), especially those from the genus *Lactobacillus*, include species that are very closely related. Many of these species have probiotic characteristics and, therefore, have many applications in the food and feed industry.

Probiotics such as those from *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera are often related to beneficial effects on the health of the host [1, 2]. The use of these microorganisms in food or drugs has rapidly grown. The market of probiotics, whose sales have reached approximately US \$ 15 billion in 2007, is expected to exceed US \$ 19.6 billion, in 2013 [3]. Simultaneously, the increase in the safety criteria for products requires precise identification of the microorganisms and the monitoring of their effects on the host.

Lactobacillus plantarum is an important probiotic non-“starter” (NSLAB), and it was the first *Lactobacillus* that had its entire genome sequenced [4, 5]. Recent studies have attributed to *L. plantarum* the abilities to modulate the immune system [6], reduce the risk of cardiovascular disease [7], alleviate intestinal disorders [8], lower LDL cholesterol [9], produce folate [10], and participate in many fermentation processes important for the food industry [11].

Currently, models for the studies of probiotic therapy are based on the ability of these organisms to survive and colonize in the host, acting as regulators and health promoters. In this way, the identification, monitoring, and quantification of

G. N. Costa (✉)
Programa de pós graduação em Ciência de Alimentos,
DCTA - Universidade Estadual de Londrina,
PO Box 6001, Londrina, Paraná 86051-990, Brazil
e-mail: gcnobre@gmail.com

G. T. Vilas-Bôas · L. A. Vilas-Boas
Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Londrina, PO Box 6001,
Londrina, Paraná 86051-990, Brazil

L. H. S. Miglioranza
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina,
PO Box 6001, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil

the probiotic microorganisms in food, as well as in the gastrointestinal tract or other habitats, contribute substantially to the understanding of the phenomena related to the interactions among these organisms.

However, the identification of the lactobacilli is generally based on the colony morphology and biochemical tests involving the ability of these microorganisms to metabolize sugars and to produce organic acids. Consequently, the specific recognition among species by the genetic similarities is difficult because the bacteria with intermediate characteristics are non-differentiated or even incorrectly characterized. Furthermore, studies emphasize that the classification of lactobacilli does not reflect the accurate phylogenetic relationships between different species and strains [12].

Nevertheless, in recent decades, genetic and chemotaxonomic approaches have been used successfully in the classification and identification of this bacteria group [8, 13, 14]. The use of molecular markers based on the amplification of specific regions of the genome by polymerase chain reaction (PCR) has widely been used for the identification of the *Lactobacillus*. Additionally, the use of bioinformatics tools along with access to available databases in the GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology Information) has boosted research, aiming at the development of strategies for identifying target species. The use of these technologies allows the comprehension of phenomena related to the interactions among the organisms and the environment in which they inhabit [15–18].

In this study, we analyzed the nucleotides sequence from the *recA* gene of the LAB, bifidobacteria, and enteric bacteria, aiming to evaluate the gene conservation among these species. We designed specific primers that, under optimized PCR conditions, could discriminate *L. plantarum* strains from others taxonomically similar to LAB and also from enteric bacteria. This methodology was also used for the identification and detection of the target specie in fermented milk products and the supplements to the animal feed.

Materials and methods

Sequences reference alignments and phylogenetic study

All nucleotide sequences are available from GenBank on July 22, 2009. The alignments and comparison were performed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 4.0 [19] using the *Clustal W* multiple alignment algorithm. Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method based in the Nei's distances [20]. The percentage of bootstrap confidence levels for the internal branches, as defined by the MEGA program, was calculated from 1,000 random replications.

Table 1 Bacterial strains analyzed to study the conservation of the *recA* gene and the respective access numbers on the GenBank/NCBI

Bacterial strains	GeneBank access no.
<i>L. acidophilus</i> NCFM	NC_006814.3
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	NZ_ACHN01000047.1
<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1
<i>L. casei</i> BL23	NC_010999.1
<i>L. casei</i> ATCC 334 ^T	CP000423.1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 ^T	NC_008054.1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> BAA365	NC_008529.1
<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610.1
<i>L. gasseri</i> ATCC 33323 ^T	NC_008530.1
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	DQ826134.1
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	NC_005362
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NCFB 151 ^T	AJ621664.1
<i>L. paraplantarum</i> LMG 16673 ^T	AJ621662.1
<i>L. plantarum</i> JDM1	NC_012984.1
<i>L. plantarum</i> WCFS1	NC_004567.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T	AJ621668.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentinaensis</i> DK022 ^T	AJ640079.1
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentinaensis</i> A7	AJ640080.1
<i>L. pentosus</i> LMG 10755 ^T	AJ621666.1
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	FM179322.1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140 ^T	NC_012815.1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> AD011	NC_011835.1
<i>E. coli</i>	V00328.1
<i>E. coli</i>	X55552.1
<i>E. faecalis</i> V583	NC_004668.1
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> LMG 18311	NC_006448.1
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> LMD9	AJ278527.1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	NC_006905.1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> P125109	NC_011294.1
<i>B. thuringiensis</i>	NC_008600.1

The sequences of the *recA* gene from thirty bacteria strains were evaluated. Twenty-nine complete sequences and one partial sequence (Table 1) were recovered from the GenBank database and used for the phylogenetic analysis and primer design.

Primer design

Primers were selected from a *recA* gene region conserved among all *L. plantarum* complete sequences recovered from the GenBank database. Primers were designed using the software package Primer Express 4.0 (Applied Biosystems,

Table 2 Bacterial strains used for PCR specificity verification

Bacterial strains, abbreviations ^a	Source
<i>L. acidophilus</i> , La3 TM	Clerici/Sacco, Brazil
<i>L. brevis</i> , Lb	ATCC 367
<i>L. casei</i> , La1 TM	Christian Hansen, Brazil
<i>L. delbrueckii</i> , Ld	ATCC 11842 ⁷
<i>L. fermentum</i> , Lf	ATCC 4338
<i>L. gasseri</i> , Lg	ATCC 33323 ⁷
<i>L. helveticus</i> TM , Lh	Danisco, Brazil
<i>L. paracasei</i> , LpC	ATCC 27962
<i>L. pasteurii</i> , LpP	ATCC 8041 ⁷
<i>L. plantarum</i> , LpR	DSM 10641
<i>L. plantarum</i> , Lp	ATCC 14917 ⁷
<i>L. plantarum</i> , BG112 TM	Clerici/Sacco, Italy
<i>L. plantarum</i> , Lp115 TM	Danisco, Brazil
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , Y180 TM	Christian Hansen, Brazil
<i>E. faecalis</i> , Ef	ATCC 29212
<i>B. subtilis</i> , BB12 TM	Christian Hansen, Brazil
<i>B. lactis</i> , HN010 TM	Danisco, Brazil
<i>E. coli</i> , Ec	ATCC 25922
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , St	ATCC 14028

^a The abbreviation of names is also used in Fig. 1a

California, USA), with melting temperatures of 58 and 67 °C and amplicon size of 168 bp. The specificities of the primers were evaluated by nucleotide similarity searches with the BLAST algorithm for short, nearly exact matches at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Additionally, the PCR amplification was evaluated with DNA samples from the bacterial species listed in Table 2 and from food and feed samples.

Bacterial strains and growth conditions

All strains were either derived from culture collections or trade strains (Table 2). The LAB and *Bifidobacterium* strains were grown anaerobically in MRS medium (De Man Rogosa and Sharpe—Oxoid, Cambridge, UK with system Anaerobac, Probac, São Paulo, Brazil) and incubated at 37 °C for 48 h. The other bacterial strains were grown aerobically in BHI medium (Brain-Heart Infusion—Oxoid, Cambridge, UK) and incubated at 37 °C for 24 h.

Food samples

The food samples used were composed of fermented milk products and the supplements used in animal feed. The kefir (K) and fermented milk (M) were prepared in the

laboratory, and the supplements to the animal feed with the *L. plantarum* strain (bulk powderTM IT—Christian Hansen, Brazil) (S) and yogurt (Y) were obtained from the manufacturers. The Kefir samples were prepared with skim milk and 10% (w/v) sugar and were fermented with the Lyofast MT036 LV culture (Clerici-Sacco, Italy), composed of *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc* spp., *L. brevis*, and *Saccharomyces cerevisiae*/24 h at 24 °C. Furthermore, the same product was prepared with the addition of the Lyofast MT036 LV and *L. plantarum*—Lp 115 cultures (Danisco, Brazil) (K+Lp). The fermented milk contained skim milk, 10% sugar, and the *L. plantarum*—Lp 115 culture and was fermented for 16 h at 37 °C. The samples were stored under refrigeration until use.

The fermented milk samples (1 mL) and the supplement to the animal feed (1 g) were serially diluted (1:10) with buffered peptone water (0.1% w/v) in the range of 10⁻¹–10⁻¹⁰ and plated on MRS agar pour plates for the determination of the total count of *L. plantarum*.

DNA extraction

DNA extraction from bacterial broth culture

Genomic DNA was isolated using a protocol previously described by Guimonde et al. [21], with some modifications. All bacterial strains were freshly grown until an OD_{600nm} ≈ 1.0 in MRS or BHI media. Aliquots of 1 mL of culture were centrifuged (5 min at 10,000×g), washed twice with TE buffer (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0—Invitrogen, São Paulo, Brazil), and resuspended in 0.2 mL TE buffer. The cell suspensions were kept in a boiling water bath for 10 min to lyse the cells and then chilled on ice. The resulting cell lysate was centrifuged (10 min at 10,000×g), and the DNA concentration and purity were measured with a spectrophotometer (Gene quantTM 1300—General Electric—Cambridge, UK). The DNA samples were stored at -20 °C.

DNA extraction from food samples

The food samples were collected aseptically; 1.0 g or 1.0 mL was homogenized and washed in TE buffer. The sample S was diluted in 9 mL of 0.1% (w/v) in buffered peptone water (Oxoid, Cambridge, UK) 1:10 (w/v). All the samples were subjected to DNA extraction from 1 mL of each suspension, by boiling procedure, according to the DNA extraction from cultures.

PCR conditions

The PCR mixtures were performed in 20 µL of the reaction containing 50 ng of the genomic DNA from bacteria, 2 µL

of PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0.8 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 0.5 μM of each primer LPreA, and 1.0 U of Taq DNA polymerase (all reagents from Invitrogen, S. Paulo, Brazil). The PCRs were run in the thermocycler (MJ Research PT 100—Watertown, EUA) under the following conditions: a single denaturation step of 2 min at 94 °C, 40 cycles of 45 s denaturation at 94 °C, 45 s annealing at 67 °C, and 30 s extension at 72 °C, with a final elongation step of 4 min at 72 °C. After the amplification, 20 μL of sample from each PCR mixture was electrophoresed in agarose gel at 2% (w/v) in TEB buffer (89 mM Boric acid, 89 mM Tris and 2.5 mM EDTA, pH 8.3), stained with 0.8 μL of Sybr Safe (Invitrogen—Oregon, EUA), run at 3 Vcm⁻¹, and visualized and registered in the photodocument (Locus L-PIX HE—Campo Belo, S.P, Brazil).

The identical conditions were applied to the amplification of DNA from the food samples, with the exception of the quantity of DNA that was not determined previously.

Specificity and detection limit of *L. plantarum*

PCR specificity was tested by the amplification of DNA samples extracted from 19 bacteria, shown in Table 2. Furthermore, the specificity was also determined from five food samples in which *L. plantarum* and/or other bacterial species were present.

L. plantarum—LPI15 was cultured in MRS broth and serially diluted in TE buffer (10⁻¹–10⁻¹⁰). The DNA was extracted from each dilution, and posteriorly, it was used for the determination the limits of detection of PCR. Additionally, this culture was serially diluted (10⁻¹–10⁻¹⁰) in buffered peptone water (0.1% w/v) and plated on MRS agar to determine the cell count (expressed as CFU mL⁻¹). The plates were incubated under anaerobiosis for 48 h at 37 °C.

The lowest concentration of DNA that produced an amplicon visible for the expected size on the gel was designated as the detection limit of the PCR.

Results and discussion

Alignment of *recA* sequences

The complete nucleotide sequences of the *recA* gene from 30 bacterial strains including *Bifidobacterium*, *Enterobacterium*, *Bacillus* and several different genera representing the LAB group (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Enterococcus*) were recovered from the GenBank database. For the *L. paracasei* subsp. *paracasei* (accession no. AJ621664.1), a partial sequence with 600 bp has been used because no complete sequences are available prior to July 2009 for this species. All complete sequences ranged from

996 to 1,916 bp. The complete sequences of *recA* from the *Lactobacillus* species are comprised of approximately 1,150 bp.

Alignment has been performed to identify a common region among all bacterial sequences; some fragments were removed of the sequences aiming for a consensus region. This fragment with 995 bp containing gaps allowed a region with variation enough to the construction of a phylogenetic tree and the design of specific primer.

Phylogenetic analyses

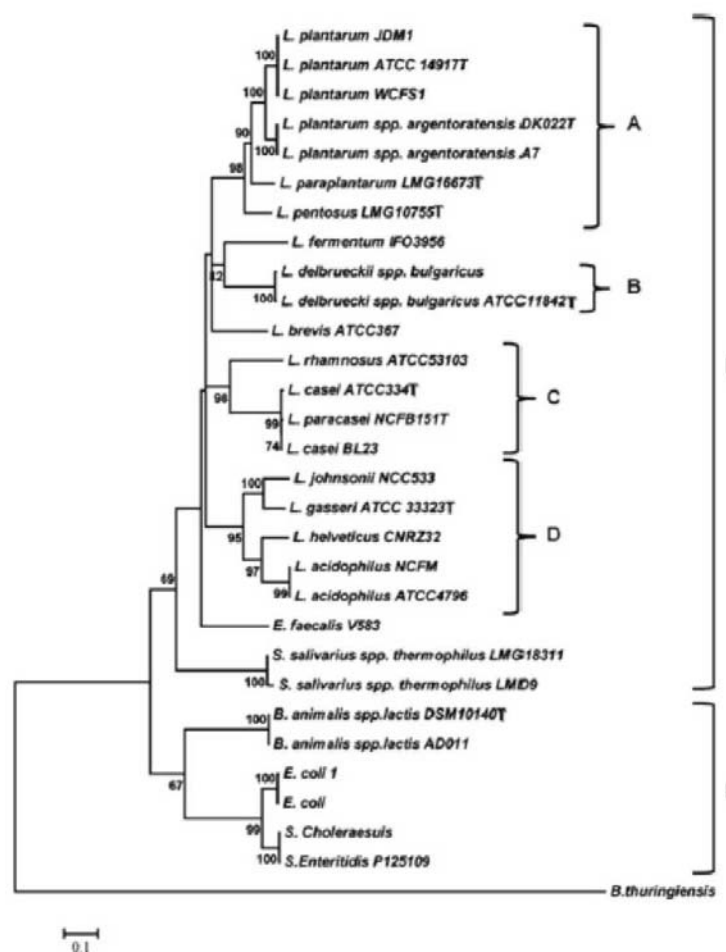
A phylogenetic tree was constructed from common sequences of 995 bp using the neighbor-joining method, based on Nei's distances (Fig. 1). Two major clusters were identified as follows: cluster I, composed of sequences of LAB species, including *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Enterococcus*, and cluster II, composed of bifidobacteria and enterobacteria strains. The *B. thuringiensis* sequence was used as out group.

Cluster I is comprised of four main groups as follows: (A) (*L. plantarum*, *L. paraplantarum*, and *L. pentosus* sequences); (B) (*L. delbrueckii* sequences); (C) (*L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus* sequences), and (D) (sequences of four different *Lactobacillus* species). These groups were previously reported [22, 23] as group of *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, and *L. acidophilus*, respectively.

Among the BAL (cluster I), only *L. brevis*, *L. fermentum*, and *E. faecalis* are allocated into branches distinct from those of the four main groups (A, B, C, and D). Natar and collaborators [23], using the *pheS* and the *rpmA* genes, classified the two *Lactobacillus* strains as members of groups *L. buchneri* and *L. reuteri*, respectively. Neither one of these species were used in this work. The *Enterococcus* is commonly associated with LAB due to the "low GC" content [24]; however, the positioning of this species has been variable with respect to the lactobacilli species. *Enterococcus faecalis* was previously related to *L. sakei* using the 16S rRNA gene and allocated alone when the *abc* (ATP Binding Protein) gene was used as molecular marker [25].

The sequences of the *L. plantarum* strains were grouped into a single branch. *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, and *L. pentosus* species, known as belonging to the *L. plantarum* group, were allocated into different branches, but inserted in the group of facultative heterofermentative bacteria (group A, Fig. 1). Similar results were observed in the previous studies [22, 26, 27]. Subtle differences in the nucleotide composition of the *L. plantarum* subsp. *argento-ratonensis* have permitted its grouping in a close, but distinct subgroup of the strains of *L. plantarum*. This fact shows a high discriminatory ability of the *recA* gene fragment for

Fig. 1 The phylogenetic tree *consensus* constructed from the comparisons of *recA* gene sequence, demonstrating the relationship of *Lactobacillus plantarum* to other closely related species. The tree was constructed with the neighbor-joining method and the Clustal W algorithm. Genetic distances were computed using Nei's coefficient. Bootstrap values based on 1,000 replicates are provided at branch nodes. The *B. thuringiensis* sequence was included as an outgroup sequence. The scale bar represents 10% sequence divergence



the species of lactobacilli. Huang and colleagues [26] observed a similar pattern of clustering for the *L. plantarum* group using the *dnaK* gene; nevertheless, based on 16S rRNA, there were no differences in the subspecies level.

In fact, the 16S rRNA gene is not suitable for definitive differentiation of the *Lactobacillus* group due to sequence similarities of up to 99% among some species [14, 26]. On the other hand, the use of the *recA* gene provided resolution for the differentiation of these species, as our data show.

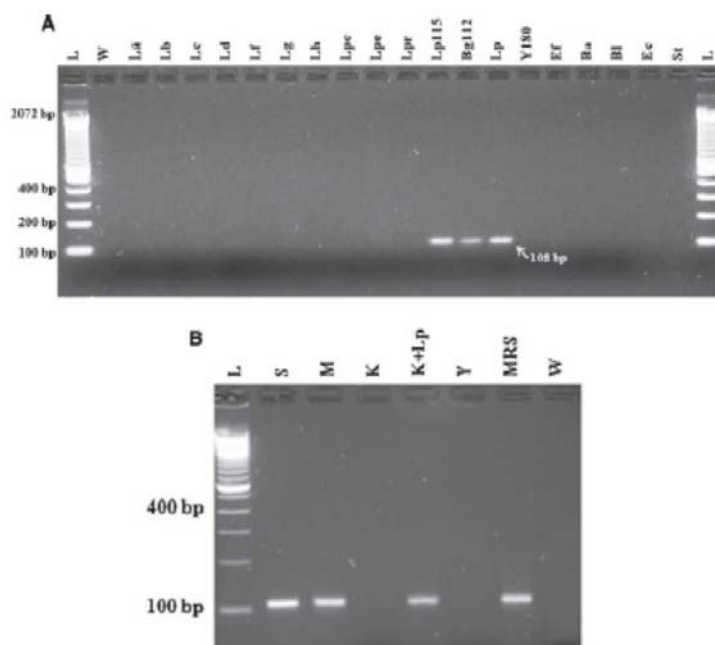
Within each group (B, C, and D), the species are phylogenetically closely related. It was observed that the branches with strains of same species have bootstrap values of 99–100%, as expected for a gene with high conservation patterns. The exception was seen in cluster C in which

distinct species such as *L. paracasei* NCFB 151^T and *L. casei* ATCC 334^T were allocated in the same branch with a bootstrap value of 74%. This inconsistency may be attributed to the incomplete sequence of the *recA* gene used for the *L. paracasei* species. Furthermore, several researchers argue that there is reasonable evidence for the reclassification of the *L. casei* ATCC 334^T strain as well as the detachment of the high similarity of the *L. paracasei* NCFB 151^T and the *L. casei* species [22, 28]. Besides, the results of Felis et al. [29] did not differ phylogenetically this group.

Bifidobacteria and enteric bacteria were allocated in cluster II, which consisted in two different groups with common origin and a bootstrap value of 67%. These classes, *Bifidobacteriaceae* and *Enterobacteraceae*, are often

obtained in the PCR-based assays even with the use of a 12. Zhong W, Millsao K, Bialkowska-Hobrzanska H, Reid G (1998)

Fig. 3 Electrophoresis of the PCR product with 108 bp in a 2% agarose gel obtained from 19 bacterial strains cultures (a) whose identifications are shown in Table 2 and from food samples (b) *S* Supplement to the animal feed, *M* Fermented milk, with the *L. plantarum* Lp115 strain, *K* Kefir, *K+Lp* Kefir added to *L. plantarum* Lp115, *Y* Yogurt, *MRS* MRS broth culture of *L. plantarum* Lp115, *W* Water negative control, and *L* 100 bp DNA Ladder



observed a detection limit ranging from 10^1 to 10^4 CFU mL⁻¹ of the *E. coli* in dairy products. Nevertheless, the detection levels in whey powder were higher ($\geq 10^6$ and 10^4 CFU mL⁻¹). The authors have argued that the whey components caused inhibition of cell lysis and/or deficient DNA recovery. On the other hand, we did not observe this difficulty in the analysis of supplement to the animal feed, which contains whey powder.

In this study, the animal feed supplement composed of a fermented whey powder has been analyzed by means of the boiling method. The detection limit of the *L. plantarum* in that supplement was 1×10^3 CFU g⁻¹ (Data not shown). Additionally, the results obtained for dairy products showed the same detection limit. These results are in agreement with other authors [37, 38] whose, by means of conventional PCR, have reported the detection limit at the range of 10^2 – 10^4 CFU mL⁻¹ to LAB, in culture broth and dairy products.

When DNA from a culture broth was submitted to serial dilutions, the detection limit was 7×10^2 CFU mL⁻¹, based on a culture with 7×10^{10} CFU mL⁻¹ (Fig. 4). This is a clear indication that the reaction can occur even in very small amounts of target DNA. In addition, the amplification of the same fragment was obtained using 500–0.005 ng of DNA in the reaction (data not shown).

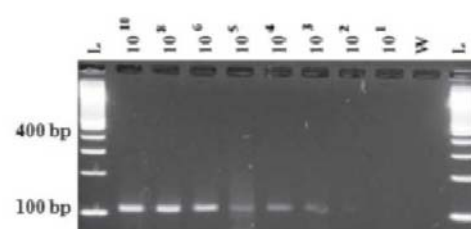


Fig. 4 Electrophoresis in a 2% agarose gel of the selected PCR products with 108 bp, from the DNA of the *L. plantarum*—LP115 with the PCR detection limits obtained by serial dilutions to be in the range of 7×10^{10} to 7×10^1 CFU mL⁻¹, *L* 100 bp DNA Lader

Conclusions

The combination of bioinformatics and molecular tools allowed the molecular identification of *L. plantarum* and its differentiation from closely related species such as *L. paraplantarum* and *L. pentosus*. Additionally, the developed primer set resulted in a simple, rapid, and highly sensitive method for the identification and monitoring of *L. plantarum* in food samples, since low detection limits were

obtained in the PCR-based assays even with the use of a simple methodology of DNA extraction.

Therefore, primers LPrec AF and LPrecAR could be useful in conventional or quantitative PCR for investigation of the *L. plantarum* specie in foods, silages, or in the studies aimed to define the characteristics of the autochthonous microbiota (permanent members) and possible changes in the allochthonous species (transient colonizers), as well as, provide information to understand the dynamics of these complex ecosystems.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge Danisco, C. Hansen, and Sacco Companies by cultures donation, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, process: 140352/2008-2 for grants to G.N.C and the financial support from Fundação Araucária. We also thank to Fernando Mucado (UEL), for critically reading the manuscript.

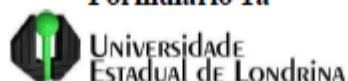
References

- Bonifazi SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeier J, Vaara M, Valtonen V (2005) Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. Clin Infect Dis 36:775–780
- Heymans M, Ménéz S (2002) Probiotic microorganisms: how they affect intestinal physiology. Cell Mol Life Sci 29:1151–1165
- Aghayati R (2008) The probiotics market: Ingredients, supplements, foods—POD035B. Food & Beverage, June 2008. Available from <http://www.bccna.com/supac/POD035B.html>. Accessed 08 June 2010
- Classen ML, Sirdano D, O'neil PW (2007) The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. FEMS Microbiol Lett 269:22–28
- Klaassen M, Bokhorst J, Van Kraaijst R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stokker W, Lankester RM, Bron PA, Hofer SM, Groot MN, Keekstra R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Smeets RJ (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci U S A 100(4):1990–1995
- Pachillo R, Caratelli CR, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A (2009) Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. Int Immunopharmacol 9:1265–1271
- Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Dowmer D, Erikowicz H (2002) Effect of *Lactobacillus plantarum* 2997 on cardiovascular disease risk factors in smokers. Am J Clin Nutr 76:1240–1253
- Yeo D, Chung J, Scharsens H, Poole F, Mochanah T, McKenzie B, Kleinhecht MA, Owyang A, Manson J, Blumenschein W, Murphy E, Saha M, Cui DJ, Kasstein RA, Renick D (2006) IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest 116:1310–1316
- Bukowska H, Piecuch-Mról J, Jastrzębska M, Chelstowski K, Naruszewicz M (1997) Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. Atherosclerosis 137:437–438
- Hugenschmidt S, Schwesinger SM, Goehn N, Lacroix C (2010) Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. Inter Dairy J 20:852–857
- Quere F, Deschamps A, Urdaci MC (1997) DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 82:783–790
- Zhong W, Millsap K, Bialkowska-Hobrzanska H, Reid G (1998) Differentiation of *Lactobacillus* Species by molecular typing. Appl Environ Microbiol 64(7):2418–2423
- Berger B, Fridman RD, Baretto C, Delmas-Julien F (2007) Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. J Bacteriol 189:1311–1321
- Collins MD, Rodrigues UM, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, Phillips BA, Williams AM, Wallbanks S (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol Lett 77:3–12
- O'Flaherty S, Klaassen TR (2010) The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/hoat. Int Dairy J 20:262–268
- Qin J, Li R, Rao J, Arunagani M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu H, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zhang H, Xia Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Bato JM, Hausen T, Le Paslier D, Lindeberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doree J, Guimier F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Consortium Meta HIT, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464:59–66
- Del Pizzo M, Morell L, Stromi GP, Allarina S, Barba M, Daida F (2006) Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis 38(2):248–255
- Walker WA, Goulet O, Mosilli L, Antonis JM (2006) Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. Eur J Clin Nutr 60(1):1–18
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596–1599
- Nei M (1986) Definition and estimation of fixation indices. Evolution 40(3):643–645
- Gueirraode M, Tokko S, Korpimäki T, Salminen S (2004) New Real-Time Quantitative PCR procedure for quantification of *Bifidobacteria* in human fecal samples. Appl Environ Microbiol 70:4165–4169
- Singh S, Gorwami P, Singh R, Heller KJ (2009) Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. LWT-Food Sci Technol 42:448–457
- Nasar SM, Dawood P, Hossain B, Gevers D, Vandecastelbroeck K, Claessens I, Vancannst M, Swings J (2007) Identification of *Lactobacilli* by *pheS* and *spoA* gene sequence analysis. Int System Evol Microbiol 57:2777–2789
- Mather S, Singh R (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—A review. Int J Food Microbiol 105:281–295
- Dewangan R, Patel A, Khatri S, Choubey J, Verma MK, Kumar Gupta S, Rishi V (2009) Phylogenetic analysis of *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains on the basis of *abc* (Atp Binding Protein) gene sequences. Curr Res J Biol Sci 1(5):127–130
- Huang CH, Lee FL, Lion JS (2010) Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial *dnaK* sequence and DNA fingerprinting techniques. Antonie van Leeuwenhoek 97:2892–2895
- Toniani S, Felis GE, Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl Environ Microbiol 67(8):3430–3434
- Vázquez A, Molin G, Pettenuzzo B, Antonsson M, Ahrens S (2005) DNA-based classification and sequence heterogeneity in the *L68*

- rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Syst Appl Microbiol* 28(5):430–441
29. Felli GE, Dellaglio F, Mizzi L, Toriani S (2001) Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int J Syst Evol Microbiol* 151(6):2113–2117
 30. Tiihonen K, Ourvilland AC, Rautonen H (2010) Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev* 9:106–117
 31. Akimov VN, Sidarecka AV, Novik GI (2008) Application of molecular methods to classification and identification of bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* 77:251–260
 32. Gomes AMP, Malcata FX (1999) Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. *Bol Biotecnol* 64:12–22
 33. Holzgäfel WH, Stils ME (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29
 34. Lee JH, Kim M, Um S (2004) PCR-based Detection and Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, and *Lactobacillus paraplantarum* in Kimchi. *Food Sci Biotechnol* 13(6):754–775
 35. Picozzi C, D'Aachise F, Foschino R (2006) PCR detection of *Lactobacillus sanfranciscensis* in sourdough and panettone baked product. *Eur Food Res Technol* 222:330–335
 36. McKillip JL, Jaykus LA, Drake MA (2000) A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *J Appl Microbiol* 89:40–55
 37. Zago M, Rossetti L, Boiaheimer J, Carnisati D, Giraffa G (2008) Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *J Dairy Res* 75:196–201
 38. Dickinson J, Kroll RG, Grant KA (1995) The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letts Appl Microbiol* 20:212–216

ANEXO B

Formulário 1a



FORMULÁRIO DE CADASTRO DE PROJETOS VINCULADOS AOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO / DIRETORIA DE PESQUISA

DIVISÃO DE CADASTRO E ACOMPANHAMENTO/SETOR DE CADASTRO E ACOMPANHAMENTO

TÍTULO INICIAL: *“Marcadores moleculares para monitoramento da colonização de microrganismos probióticos “in vivo” e avaliação da transferência de resistência a antibióticos”.*

CLASSIFICAÇÃO DO PROJETO CONFORME TABELA DE ÁREAS DO CNPq

ÁREA: Ciência e Tecnologia de Alimentos (5.07.00.00-6)

SUB-ÁREA: Ciência de Alimentos (5.07.01.00-2)

ESPECIALIDADE (SE HOVER):

PALAVRAS CHAVE (INDICAR NO MÁXIMO SEIS)

1. Probióticos	2. <i>B. lactis</i>
3. Bactéria Láctica	4. PCR em tempo real
5. <i>L. plantarum</i>	6. Genes de resistência

ASSINALAR O TIPO DE PESQUISA

MESTRADO DOUTORADO CLASSIFICAÇÃO: BÁSICA OU APLICADA
 APLICADA PODENDO GERAR: 1) *DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO* 2) *BIOTECNOLOGIA*
 3) *NOVOS MATERIAIS* 4) *QUÍMICA FINA*

NOME DO ORIENTADOR: Lúcia Helena Silva Miglioranza

CENTRO/DEPARTAMENTO: Centro de Ciências Agrárias/ Depto. de Ciências e Tecnologia de Alimentos

NOME DO ORIENTANDO: **Giselle Aparecida Nobre Costa**

DATA DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO COORD. DO CURSO / / . Assinatura: _____

DATA DE INÍCIO: 06 / 08 / 2007 DATA DE TÉRMINO PREVISTO: 12 / 07 / 2011

RESUMO DO PROJETO

RESUMO DO PROJETO (Em Língua Portuguesa, nos moldes de publicação em Congressos)

A literatura científica relata muitos estudos tratando do benefício de microrganismos probióticos sobre o organismo humano e animal, entretanto, informações a respeito do número de células que efetivamente colonizam e trazem efeitos benéficos ao hospedeiro ainda são escassas na literatura. Além disso, não se tem até o momento, nenhum estudo avaliando o tempo necessário de administração de probióticos para que estas bactérias colonizem o intestino hospedeiro promovendo efeito de homeostase. É desejável ainda que as bactérias probióticas exibam tolerância às substâncias antimicrobianas usadas na prática clínica, porém, não devem ser capazes de transmitir tal resistência a outras bactérias. Por esta razão, o perfil de segurança de uma linhagem probiótica potencial é de importância crítica no processo de seleção. Assim, faz-se necessário a determinação da resistência de linhagens às classes comuns de antibióticos, e da confirmação subsequente do tipo de resistência atribuído a elas. Deste modo, esse trabalho tem como objetivos, avaliar a capacidade de colonização e o período de implantação de linhagens de bactérias potencialmente probióticas no trato gastrointestinal, por detecção e enumeração destas bactérias em fezes humanas por PCR em tempo real e investigar a resistência de linhagens probióticas a antibióticos visando a determinação da resistência intrínseca e/ou adquirida, quando pertinente.

Formulário Ib

À

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
PROPPG

Na qualidade de docente/pesquisador não pertencente à Área da Saúde e tendo tomado conhecimento do documento sobre a criação, regulamentação e funcionamento do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UEL) constante da Instrução de Serviço CPG – 005/03, encaminho a essa Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, o presente Termo de Opção de Trâmite, devidamente preenchido e assinado.

TERMO DE OPÇÃO DE TRÂMITE DE PROJETO JUNTO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS NA UEL – (CEP/UEL)

Através do presente Termo de Opção, declaro, para os devidos fins, ter conhecimento das informações sobre o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL), das Resoluções CNS 196/96, CEPE no. 63, 86 e 87/2003 e também da importância do Parecer do CEP sobre meu projeto, de conformidade com a Instrução de Serviço CPG – 005/03.

Em cumprimento ao disposto nas Resoluções CEPE n.ºs. 86e 87/2003, manifesto minha decisão de que o projeto de pesquisa protocolado sob no. _____/_____, sob minha coordenação TRAMITE NÃO TRAMITE junto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL).

Estou ciente de que ao optar por NÃO TRAMITAR o projeto de pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL), assumo total responsabilidade sobre quaisquer questionamentos sobre a conduta ética deste projeto e demais conseqüências deste ato.

Londrina, ___ de Março de 2008.

Lúcia Helena da Silva Miglioranza__

Nome(a) do(a) coordenador(a) do projeto

Assinatura do(a) coordenador(a) do projeto

Formulário 3a

**À Profa. Dra.
Ester Massae Okamoto Dalla Costa
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Estadual de Londrina**

Prezada Senhora,

Temos a informar que o projeto de tese em Ciência de Alimentos da aluna Giselle Aparecida Nobre Costa, intitulado: "Marcadores moleculares para monitoramento da colonização de microrganismos probióticos "in vivo", empregará um grupo de 60 voluntários, adultos com idade superior a dezoito (18) anos, membros da comunidade acadêmica da Universidade Estadual de Londrina. A comunidade universitária receberá convite para integrar este grupo e receberão todas as orientações e informações que envolverão o estudo.

Será desenvolvido um leite fermentado contendo microrganismos probióticos, devidamente adequado às especificações da legislação vigente, que preconiza avaliação de pH e acidez titulável, ausência de contagens de mofo e leveduras, ausência de coliformes fecais, além de contagem dos microrganismos probióticos não inferior a 1×10^8 UFC/dose do produto (Ministério da agricultura e do abastecimento, regulamento: N.º36, de 31 de outubro de 2000 e Anvisa, Abril de 2008). Será utilizado leite em pó comercial, desnatado, reconstituído, adicionado de *Lactobacillus Plantarum* ou *Bifidobacterium lactis*, culturas comerciais fornecidas pelas empresas Clerici Sacco - Itália e Christian Hansen - Brasil, respectivamente. O grupo teste receberá doses diárias de 80 mL do produto, em um período de estudo variável entre 15 e 90 dias.

Seguem, no anexo, os modelos de questionário para recrutamento dos voluntários e carta de consentimento que serão utilizados.

Atenciosamente,

Profa. Dra: _____

Orientador/CCA /DCTA /UEL

QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS

Desejamos formar uma equipe de voluntários para receber 80 mL/dia de leite contendo o microrganismo *Lactobacillus plantarum*. Ser um voluntário não exigirá de você nenhuma habilidade excepcional: não ocupará muito tempo, sendo uma tarefa bastante fácil. Você poderá receber uma dose diária do produto, de segunda a sexta feira, em qualquer horário entre 8:30 e 14:00 horas, no laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA. Para avaliar a quantidade deste microrganismo no intestino, lhe será solicitado uma amostra de fezes, a cada 15 dias, enquanto prolongar a pesquisa. Será solicitada também, uma amostra 30 dias antes do início do estudo e outra, 30 dias após o final do estudo. A amostra será identificada com código numérico, e será utilizada exclusivamente para avaliação do microrganismo de interesse. Se tiver qualquer dúvida, ou necessitar de informações adicionais, entre em contato. (Profa. Lucia Miglioranza, ramal 4565, luciah@uel.br, ou Giselle Nobre, ramal 4575, gcnobre@gmail.com).

Dados Pessoais

Nome _____
 Telefone para contato / e mail _____

1-Faixa etária

- 17-25
 25-35
 35-50
 acima de 50 anos

2- Sexo

- masculino
 feminino

3- Ocupação

- aluno _____
 funcionário
 professor
 outro _____

4- Escolaridade

- 1º grau
 2º grau
 3º grau
 outro _____

5. Gosta de Leite: Sim Não

6. Gosta de Leite fermentado: Sim Não

7- Freqüência de Consumo de Leite fermentado:

Leite fermentado:

- Nunca
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Freqüentemente - _____ vezes por semana

Iogurtes:

- Nunca
 Ocasionalmente - ___ vezes por ano
 Moderadamente - ___ vezes por mês
 Freqüentemente - ___ vezes por semana

Leite:

- Nunca
 Ocasionalmente - ___ vezes por ano
 Moderadamente - ___ vezes por mês
 Freqüentemente - ___ vezes por semana

Produtos lácteos que costuma consumir

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, R.G. _____,

aceito participar do Projeto “*Marcadores moleculares para monitoramento da colonização de microrganismos probióticos*” na qualidade de voluntário. Estou informado de que:

- Receberei uma dose por dia de um leite contendo uma bactéria probiótica;
- O microrganismo contido no produto é uma linhagem comercial, testada e aprovada como segura para consumo humano;
- O produto recebido é avaliado quanto à suas características físico-químicas e microbiológicas e está adequado ao consumo humano, conforme a legislação vigente no país.

Além disso, estou informado de que:

- Serei solicitado a coletar amostras fecais em períodos pré-determinados pelo estudo e, para tanto receberei recipiente adequado;
- A amostra de fezes será utilizada apenas para verificação e quantificação do microrganismo contido no leite probiótico;
- Minha identidade e dados, exceto a quantificação do microrganismo em teste não será em nenhuma hipótese divulgado.

Entendo que, ao participar, estarei colaborando no desenvolvimento de uma tese de Doutorado, e, portanto, no treinamento e formação de um profissional.

Quaisquer dúvidas ou necessidade de informações adicionais, entre em contato. (Profa. Lucia Miglioranza, ramal 4565, luciah@uel.br, ou Giselle Nobre, ramal 4575, gcnobre@gmail.com).

Londrina, de _____ de 200 .

Formulário 3b

Planos de Saúde - Servidor

Page 1 of 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 209645	
Projeto de Pesquisa Marcadores moleculares para monitoramento da colonização de microrganismos probióticos					
Área de Conhecimento 5.05 - Ciências Agrárias - 5.07 - Ciência e Tecnologia de Alimento				Grupo Grupo I	Nível
Área(s) Temática(s) Especial(is) Pesquisa com Cooperação Estrangeira.					Fase Não se Aplica
Unitermos Bifidobacterium lactis, Lactobacillus plantarum, Real-time PCR, epitélio intestinal, adesão, genes de resistência					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 60	Total Brasil 60	Nº de Sujeitos Total 60	Grupos Especiais		
Placebo NÃO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Lucia Helena da Silva Migloranza		CPF 017.129.628-17	Identidade 6787377-7		
Área de Especialização CIÊNCIA DE ALIMENTOS		Meior Titulação DOUTORADO	Nacionalidade BRASILEIRA		
Endereço RUA RANGEL PESTANA, 510 APTD 302		Bairro CAMPO BELO	Cidade LONDRINA - PR		
Código Postal 85062-020	Telefone (43)3371-4565 / (43)3327-5112	Fax (43)3371-4080	Email luciah@rantac.net		
<p>Termo de Compromisso</p> <p>Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.</p> <p>Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.</p> <p>Data: ____/____/____ Assinatura _____</p>					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Universidade Estadual de Londrina e Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná - UEL		CNPJ 78.640.489/0001-53	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos		Participação Estrangeira SIM	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Rodovia Caleo Garcia Cid		Bairro BR.445 Km 390	Cidade Londrina - PR		
Código Postal 85051-990	Telefone 43-3371-4000	Fax 43-33294440	Email www.uel.br		
<p>Termo de Compromisso</p> <p>Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Nome: _____ Assinatura _____</p> <p>Data: ____/____/____</p>					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 30/07/2008. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

ANEXO C



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer PF Nº 174/08 CAAE Nº 0161.0.268.000-08 FOLHA DE ROSTO Nº 209645	Londrina, 08 de maio de 2009.
---	-------------------------------

PESQUISADOR: LUCIA HELENA DA SILVA MIGLIORANZA

PROPPG – processo 24746/08

Prezada Senhora:

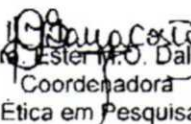
O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"MARCADORES MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS 'IN VITRO' E AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS"

Situação do Projeto: **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO**

Analisadas as respostas às pendências, aprovamos o projeto, porém com a recomendação de que seja apresentado no prazo de 6 (seis) meses a regulamentação do banco de culturas, bem como relatório parcial.

Atenciosamente,


 Prof. Dra. Ester M.O. Dalla Costa
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UJEL