

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Seleção e aplicação de bactérias lácticas produtoras de folato para obtenção de um leite fermentado bioenriquecido e avaliação da biodisponibilidade do folato produzido

Ana Clara Candelária Cucick

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco

Co-orientador: Dr. Jean Guy Joseph Leblanc

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Ana Clara Candelária Cucick

Seleção e aplicação de bactérias lácticas produtoras de folato para obtenção de um leite fermentado bioenriquecido e avaliação da biodisponibilidade do folato produzido

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco

Co-orientador: Dr. Jean Guy Joseph Leblanc

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C963s	Cucick, Ana Clara Candelária Seleção e aplicação de bactérias lácticas produtoras de folato para obtenção de um leite fermentado bioenriquecido e avaliação de biodisponibilidade do folato produzido / Ana Clara Candelária Cucick. - São Paulo, 2019. 69 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy Melo Coorientador: LeBlanc, Jean Guy Joseph
	1. Bactérias Lácticas. 2. Folato. 3. Biodisponibilidade. I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy Melo, orientador. III. LeBlanc, Jean Guy Joseph, coorientador.

Ana Clara Candelária Cucick

Seleção e aplicação de bactérias lácticas produtoras de folato
para obtenção de um leite fermentado bioenriquecido e
avaliação da biodisponibilidade do folato produzido

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter me guiado e permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Carmen e David que me proporcionaram de todas as formas tudo o que precisei para investir em meus sonhos, me auxiliando tanto financeiramente quanto emocionalmente.

À minha irmã, Maria Laura, que sempre me ajudou e me incentivou.

Às minhas tias, Angela e Célia, que contribuíram para meu crescimento.

À toda a minha família que sempre me apoiou e torceu por mim.

À Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco, pela oportunidade, confiança, aprendizagem e suporte para a realização deste trabalho.

À meu co-orientador Dr. JeanGuy Leblanc que compartilhou um pouco de seu conhecimento comigo e me auxiliou de todas as maneiras e a sua esposa, Dra. Alejandra de Moreno Leblanc, que me deram todo o suporte necessário quando estive na Argentina.

Ao Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA) que, através da parceria com a USP permitiu que eu desenvolvesse uma parte importante de meu trabalho.

Ao PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) que me recebeu e auxiliou no processo de fermentação láctea.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro que me possibilitou desenvolver uma parte do projeto na Argentina.

Ao FORC (Food Research Center) que contribuiu para o desenvolvimento deste projeto.

À Kátia Leani e Lúcia, funcionárias do laboratório de microbiologia da USP, por toda ajuda, amizade, paciência e ensinamentos.

Aos companheiros de laboratórios que se tornaram amigos: Carlos, Marcelo, Gabriela, Rubia e Sarah. Levo vocês no coração.

Aos Professores Mariza Landgraf e Uelinton Pinto por toda a contribuição, ensinamentos e valiosas sugestões.

Ao Svetoslav Todorov, por compartilhar seu conhecimento e estar sempre disposto a ajudar.

À todos os colegas de laboratório que me acompanharam nesses anos, pelos momentos de alegria que tivemos juntos.

À Marcela Albuquerque que desde o início compartilhou seus conhecimentos comigo.

Aos meus amigos sempre presentes na minha vida que me apoiam desde sempre: Mariana Neri, Bruna Bueri, Rafaela, Talita, Rafael, Daniel e Laura.

À todos professores da USP com os quais tive a oportunidade de adquirir ensinamentos através de disciplinas, palestras e conselhos.

A todos funcionários da FCF/USP pela atitude sempre colaborativa.

RESUMO

CUCICK, A.C.C. **Seleção e aplicação de bactérias lácticas produtoras de folato para obtenção de um leite fermentado bioenriquecido e avaliação de biodisponibilidade do folato produzido.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2019.

A deficiência de folato é um problema de saúde pública que vem sendo combatido através da fortificação obrigatória de ácido fólico. Entretanto, a ingestão excessiva pode causar efeitos colaterais indesejados. A forma natural da vitamina produzida por algumas cepas de bactérias lácticas pode ser uma alternativa segura para aumentar a ingestão de folato pela população. Este trabalho visou selecionar as melhores cepas de BAL produtoras de folato, identificar as melhores condições para a produção da vitamina e avaliar a biodisponibilidade do folato produzido pelas cepas no leite fermentado, empregando-se testes em modelos animais. O estudo foi desenvolvido com cinco cepas de *Streptococcus thermophilus* (34v, 170v, 268v, 361v e 341 pc) e um cepa de *Lactobacillus plantarum* (16cv), todas boas produtoras de folato. As condições de produção e a combinação de cepas que resultaram na melhor produção folato foram utilizadas para produzir um leite biofermentado (BFM), avaliando-se a biodisponibilidade da vitamina produzida empregando-se um modelo animal de depleção/repleção, com camundongos Balb/c submetidos a 14 dias de depleção, seguido de 21 dias de repleção da vitamina. Após os 35 dias, os animais foram sacrificados, retirando-se sangue, rins, fígado, baço e intestino para quantificação de folato e avaliação histológica da mucosa intestinal. Todas as quantificações de folato foram feitas pelo método microbiológico. A melhor combinação de cepas (*St. thermophilus* 34v + *Lb. plantarum* 16cv) resultou na produção de 300 ng/mL de folato, sendo a temperatura de 42°C melhor que 37°C para a produção da vitamina. A produção de folato no leite na fermentação em pH controlado 6,0 foi 35% superior à observada no leite fermentado em pH livre. As concentrações de folato no baço e glóbulos vermelhos foram mais altas nos camundongos que ingeriram leite fermentado bioenriquecido (BFM) em relação aos demais grupos de animais. A relação vilosidade/cripta nos camundongos dos grupos BFM foi igual à observada nos animais que receberam leite suplementado com ácido fólico. Houve aumento da hemoglobina, hematócrito e hemácias nos camundongos que ingeriram BFM, evidenciando a bioeficácia do folato produzido. Esses resultados indicam que a produção de folato por bactérias lácticas selecionadas em produtos fermentados pode ser uma boa alternativa para aumentar a ingestão de vitamina B9 pela população.

Palavras-chave: Folato, vitamina B9, bactérias lácticas, biodisponibilidade, leite fermentado.

ABSTRACT

CUCICK, A.C.C. **Screening and application of folate-producing lactic acid bacteria for production of bioenriched fermented milk and evaluation of the bioavailability of the produced folate.** Dissertation (Master Degree). Graduate Program in Food Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, SP, Brazil, 2019.

Folate deficiency is a public health problem that has been tackled through mandatory fortification of folic acid. However, excessive intake can cause unwanted side effects. The natural form of the vitamin produced by some strains of lactic acid bacteria (BAL) may be a safe alternative to increase folate intake by the population. The objective of this study was to select the best folate-producing BAL strains, to identify the best conditions for vitamin production and to evaluate the bioavailability of folate produced by the strains in fermented milk, using tests in animal models. The study was carried out with five strains of *Streptococcus thermophilus* (34v, 170v, 268v, 361v and 341 pc) and a strain of *Lactobacillus plantarum* (16 cv), all good folate producers. The conditions of production and the combination of strains that resulted in the best folate production were used to produce a biofermented milk (BFM), evaluating the bioavailability of the vitamin produced using a animal model of depletion/repletion with Balb/c mice submitted to 14 days of vitamin depletion, followed by 21 days of repletion. After 35 days, the animals were sacrificed, and blood, kidneys, liver, spleen and intestine were removed for quantification of folate and histological evaluation of the intestinal mucosa. All quantifications of folate were made by the microbiological method. The best combination of strains (St. thermophilus 34v + Lb. plantarum 16cv) resulted in the production of 300 ng / mL folate, the temperature being 42°C better than 37°C for vitamin production. The production of folate in milk in fermentation at controlled pH 6.0 was 35% higher than that observed in fermented milk without pH control. The villi/crypt ratio in the mice of the BFM group was the same as in animals receiving milk supplemented with folic acid. There was an increase in hemoglobin, hematocrit and red blood cells in the BFM group, evidencing the bioefficacy of the folate produced. These results indicate that folate production by selected lactic bacteria in fermented products may be a good alternative to increase vitamin B9 intake by the population.

Key-words: folate, vitamin B9, lactic acid bacteria, bioavailability, fermented milk.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das rações (Dyets, Bethlehem, USA).....	32
Tabela 2 - Primers utilizados e condições das reações de PCR.....	39
Tabela 3 - Concentração de folato extracelular (EC), intracelular (IC) e folato total produzido pelas cepas estudadas, em meio FACM	40
Tabela 4 - Hemograma dos camundongos dos diferentes grupos testados.	49
Tabela 5 - Perfil de resistência a antibióticos das cepas estudadas (resultados em mm de diâmetro do halo de inibição)	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ácido fólico (A), ácido folínico (B) e 5-MTHF (C) (SCAGLIONE E PANZAVOLTA, 2014)	17
Figura 2 - Esquema da biossíntese de folato (Wekamp et al, 2007)	21
Figura 3 - Modelo experimental depleção-repleção.	35
Figura 4 - Valores de pH dos leites contendo as cepas estudadas, nos tempos avaliados	41
Figura 5 - Multiplicação das cepas estudadas no leite a 37°C.	42
Figura 6 - Produção de folato pelas cepas em estudo em leite.....	43
Figura 7 - Quantidade de folato produzido pelas cepas estudadas em leite a 37°C por 24h	44
Figura 8 - Concentração de folato produzida nas combinações de cepas A, B, C, D e E.....	45
Figura 9 - Concentração de folato produzido pela co-cultura A em pH controlado 6 e pH livre	46
Figura 10 - Concentração de folato no fígado dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.....	50
Figura 11 - Concentração de folato no baço dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.....	51
Figura 12 - Concentração de folato nos rins dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.....	51
Figura 13 - Concentração de folato no plasma dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.....	53
Figura 14 - Concentração de folato nos glóbulos vermelhos dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA	53
Figura 15 - Relação entre comprimento da vilosidade e profundidade da cripta das células intestinais dos grupos em estudo CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.....	56
Figura 16 - Fotomicrografias representativas das células intestinais de cada grupo em estudo (ampliação 100x).	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1. Bactérias láticas	15
3.2. Folato (vitamina B9)	16
3.3. Produção de folato por bactérias láticas	18
3.4. Biodisponibilidade do folato e do ácido fólico	21
3.5. Fortificação com ácido fólico	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Seleção das cepas	24
4.2. Determinação do folato produzido pelas cepas de <i>St. thermophilus</i> e <i>Lb. plantarum</i> em meio de cultura.....	25
4.3. Determinação do folato produzido pelas cepas em estudo em leite bovino	27
4.4. Determinação do folato produzido pelas co-culturas de <i>St. thermophilus</i> e <i>Lb. plantarum</i>	28
4.4.1. Teste de difusão de poços para verificar incompatibilidade entre as cepas	28
4.4.2. Co-cultura das cepas.....	29
4.4.3. Fermentação do leite reconstituído em diferentes temperaturas e pH controlado	29
4.5. Avaliação da biodisponibilidade do folato produzido nos leites fermentados	31
4.5.1. Alimentação dos animais	31
4.5.2. Preparo dos leites experimentais para alimentação dos animais	33
4.5.3. Modelo experimental para avaliação da biodisponibilidade do folato nos leites fermentados	33
4.5.4. Preparo das amostras de órgãos e sangue para análise	35
4.5.5. Quantificação de folato das amostras de sangue e órgãos	37
4.6. Avaliação da segurança das cepas em estudo	37
4.6.1. Produção de bacteriocinas	37
4.6.2. Resistência à antibióticos	37
4.6.3. Presença de genes de virulência.....	38
4.7. Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1. Avaliação da biodisponibilidade do folato produzido no leite reconstituído ..	47
5.1.1. Concentração de folato no fígado, baço e rins dos camundongos	50
5.1.2. Concentração de folato no plasma e glóbulos vermelhos	52
5.1.3. Histologia do intestino.....	55
5.2. Avaliação da segurança das cepas estudadas	57
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Considerada como grave problema de saúde pública no mundo todo, a deficiência do folato ou vitamina B9 ocorre tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (DANTAS *et al.*, 2010; LAIÑO *et al.*, 2012;). A ingestão insuficiente dessa vitamina é prejudicial ao organismo humano, podendo causar anemia megaloblástica e más formações congênitas, principalmente defeitos no tubo neural (DTN), além de distúrbios neuropsiquiátricos, processos tromboembólicos e doenças cardiovasculares (MUSKIET & KEMPERMAN, 2006; GILBODY *et al.*, 2007; LAINO *et al.*, 2014; SAUBADE *et al.*, 2016). Por tal razão, diversos países adotaram programas de fortificação de alimentos com ácido fólico (forma sintética do folato), que é obrigatória em 63 países. Tais programas de fortificação vêm apresentando resultados positivos em países como Estados Unidos e Canadá, com a diminuição da incidência de DTN e da mortalidade neonatal (BLENCOWE *et al.*, 2010; SAUBADE *et al.*, 2016).

Contudo, a elevada ingestão de ácido fólico sintético pode causar alguns efeitos indesejados, como mascarar a deficiência de vitamina B12, e por isso alguns países não adotaram a fortificação (LAIÑO *et al.*, 2012; SAUBADE *et al.*, 2016). Como o programa de fortificação destina-se à população em geral, e não somente aos deficientes dessa vitamina ou com necessidade aumentada, existe a preocupação do consumo excessivo. Os efeitos da elevada ingestão de ácido fólico ainda não foram completamente elucidados, mas evidências sugerem relação com o surgimento de alguns tipos de câncer, tumores e lesões (KALMBACH *et al.*, 2008; KODI *et al.*, 2015).

Uma das formas de elevar os níveis de folato natural nos alimentos é o emprego de bactérias lácticas (BAL) capazes de produzir esta vitamina. As BAL representam um grupo heterogêneo de microrganismos que estão naturalmente presentes na natureza e que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para diversas finalidades. Alguns estudos mostraram que, em condições apropriadas, esses microrganismos podem ser capazes de aumentar os níveis de folato em iogurtes e produtos lácteos fermentados (LAIÑO *et al.*, 2012; LEBLANC *et al.*, 2013). Grande parte do folato produzido pelas BAL está na forma de 5-methyltetrahydrofolato (5-MTHF), que corresponde à forma de folato melhor absorvida pelo organismo humano (HOLASOVÁ *et al.*, 2005; LAIÑO *et al.*, 2012; SAINI *et al.*

2016). No estudo de Holasova et al, 2005, observou-se que o conteúdo de folato em iogurtes fermentados com *Streptococcus thermophilus* por 12h era seis vezes o encontrado no leite antes da fermentação. Wegkamp et al., (2010), relataram que *Lactobacillus plantarum* WCSF1 também produz grandes quantidades de folato. Além disso, combinações com outras culturas podem potencializar a produção de folato, como observado por Crittenden et al. (2003), que verificaram que a combinação de *Streptococcus thermophilus* com *Bifidobacterium animalis* resultou em um aumento de seis vezes no conteúdo de folato em produtos lácteos fermentados.

A biodisponibilidade do folato natural produzido por BAL pode ser diferente da do ácido fólico sintético. A cadeia de poliglutamatos presente na estrutura do folato natural e outros fatores, tais como o pH intestinal, que depende dos alimentos ingeridos, a presença de antagonistas de folato, alterações intestinais, e a taxa de esvaziamento gástrico podem afetar a biodisponibilidade (MCNULTY & PENTIEVA 2004; LEBLANC et al. 2007). Neste contexto, destaca-se o estudo de Eitenmiller e Landen, 1999, no qual se observou que a absorção do folato no intestino delgado aumenta quando há ligação às proteínas do leite.

Estima-se que a biodisponibilidade do folato seja 50% da apresentada pelo ácido fólico, mas há uma grande variação de 10% a 98%, dependendo da metodologia de avaliação (SCAGLIONE & PANZAVOLTA, 2014). Tais diferenças encontradas nos estudos podem ser atribuídas a outros fatores também: heterogeneidade da população avaliada, duração dos estudos, composição da matriz alimentar ou da refeição, uso de material de referencia não certificado e desigualdades metabólicas das diferentes formas do folato, principalmente em relação à pós-absorção e cinética plasmática (WINKELS et al, 2007; OHRVIK & WITTHOFT, 2011, SCAGLIONE & PANZAVOLTA, 2014).

Com base no exposto, evidencia-se a importância de novas pesquisas com o objetivo de desenvolver alimentos bioenriquecidos com folato natural produzido por BAL presentes nestes produtos. Além de combater a deficiência desta vitamina na população, os alimentos enriquecidos dessa forma apresentam menos riscos que os suplementados com ácido fólico sintético.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi estudar a capacidade de cepas de bactérias lácticas isoladas de alimentos produzirem folato, quando em culturas isoladas e em co-culturas e em diferentes condições de temperatura e pH, verificar a segurança dessas cepas para uma possível aplicação em alimentos e avaliar a biodisponibilidade do folato produzido em meio de cultura e em leite em pó reconstituído.

Para atingir esses objetivos, foram seguidos os seguintes passos:

- 1.1.** Seleção das melhores cepas produtoras de folato entre as bactérias lácticas disponíveis no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP;
- 1.2.** Avaliação das melhores condições de cultivo (temperatura e pH) para a produção de folato em meio de cultura e em leite em pó reconstituído;
- 1.3.** Avaliação da biodisponibilidade do folato produzido pelas cepas selecionadas em leite em pó reconstituído fermentado, empregando-se modelos animais.
- 1.4.** Avaliação da segurança das cepas produtoras de folato, pela pesquisa da presença de genes de virulência e de resistência a drogas, visando uma possível aplicação em alimentos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Bactérias lácticas

Amplamente utilizadas pela indústria de alimentos devido às suas características tecnológicas, as bactérias lácticas (BAL) são microrganismos Gram positivos, não-esporulados, catalase negativos, ácido-tolerantes e anaeróbios facultativos e possuem como propriedade metabólica mais comum a produção de ácido láctico como principal produto final da fermentação de carboidratos. As BAL pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*, e os principais gêneros são *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* e *Streptococcus*. A maioria não é patogênica, mas há alguns relatos de cepas patogênicas, pertencentes principalmente aos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Carnobacterium* (MOZZI et al, 2010; LAHTINEN et al., 2012).

As propriedades metabólicas desse grupo de bactérias as fazem muito importantes economicamente e socialmente. As BAL fermentam vegetais, pescados, carnes e leites, transformando-os em novos alimentos, mais saborosos e com vida útil mais longa. Muitas BAL são utilizadas como culturas starter pela indústria alimentícia. Por não possuírem sistema respiratório funcional, elas precisam obter energia a partir da fosforilação de substratos, por meio da fermentação, que pode ocorrer por duas vias básicas: a via homofermentativa, baseada na glicólise e que tem o ácido lático como produto final, e a heterofermentativa, na qual além de ácido lático, quantidades significativas de CO₂ e etanol ou acetato são produzidas. Outros compostos produzidos durante o metabolismo, como ácido acético, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e outras enzimas, são de grande interesse tecnológico, pois além de serem utilizados na produção de uma grande variedade de alimentos, podem melhorar sua segurança (LAHTINEN et al., 2012; SALVUCCI et al., 2016; TEUSINK; MOLENAAR, 2017).

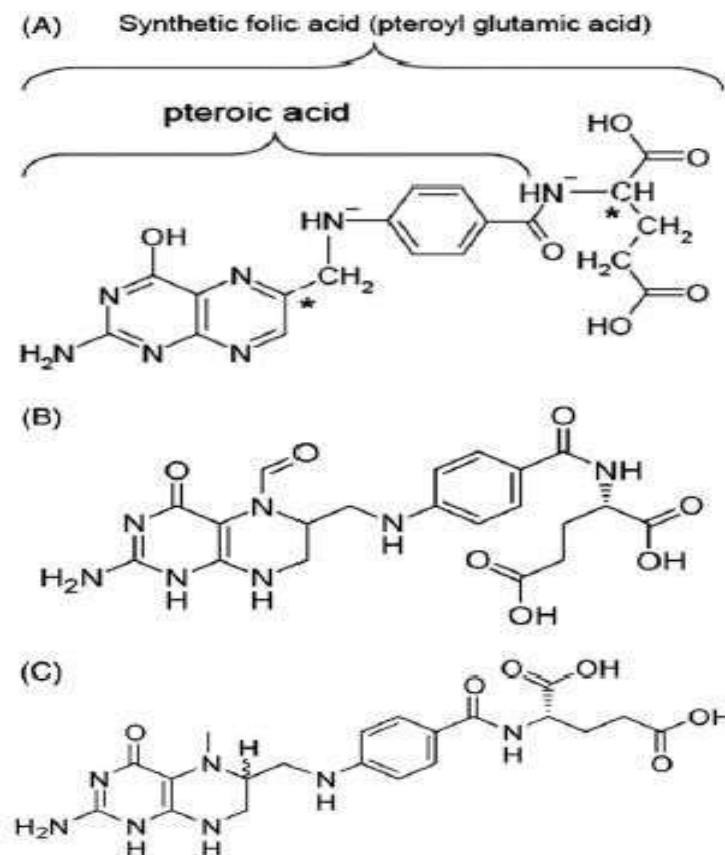
As BAL com propriedades probióticas têm alta demanda no mercado atualmente e têm sido foco de diversas pesquisas. Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde” (HILL, 2014). Os principais benefícios dos probióticos à saúde humana são melhora no trânsito gastrointestinal, fortalecimento do sistema imune intestinal devido às mudanças na microbiota intestinal, redução do colesterol, produção de ácidos graxos de cadeia curta, entre outros. Além das propriedades probióticas, algumas cepas, quando em condições adequadas de crescimento, podem produzir vitaminas do grupo B. Essa propriedade pode ser explorada para o desenvolvimento de alimentos bioenriquecidos com estas vitaminas, permitindo que a sociedade se beneficie de mais uma propriedade das BAL (LIN; YOUNG, 2000; CRITTENDEN et al., 2003; SYBESMA et al., 2003; LEBLANC et al., 2011; FEIZOLLAHZADEH et al., 2017).

3.2. Folato (vitamina B9)

Folato, também conhecido como vitamina B9, é um termo genérico dado a uma família de compostos químicos semelhantes, derivados do ácido pteróico (Figura 1). Entre eles estão os poliglutamatos, que são a forma natural presente em alimentos e

o 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), que é a forma ativa no organismo humano. Outros derivados são o 5-formiltetrahydrofolato (5-formil-THF), o 10-formiltetrahydrofolato (10-formil-THF), o 5,10-methilene-tetrahydrofolato (5,10-metileno-THF), o 5,10-metenil-tetrahydrofolato (5,10-metenil-THF), o 5-formiminotetrahydrofolato (5-formimino-THF), o 5,6,7,8-tetrahydrofolate (THF) e o dihydrofolato (DHF). O ácido fólico (ácido pteroilmonoglutâmico - PteGlu) usado para a suplementação de alimentos é um composto sintético, não encontrado na natureza, formado por um grupo pteroil ligado ao ácido glutâmico (DELCHIER et al., 2013; SCAGLIONE & PANZAVOLTA, 2014; LAIÑO et al., 2015; MEUCCI et al., 2018).

Figura 1 - Estrutura química do ácido fólico (A), ácido folínico (B) e 5-MTHF (C) (SCAGLIONE E PANZAVOLTA, 2014)



A principal função do folato no organismo é como receptor e doador de unidades de carbono, participando de ciclos metabólicos extremamente importantes, como o ciclo do DNA (ORSOMANDO et al., 2006; LAIÑO et al., 2015). Como a maioria das vitaminas, esse micronutriente não é sintetizado pelo organismo humano e deve ser obtido de maneira exógena. Apesar de ser comum nos alimentos, sua concentração é baixa. Os alimentos com maior quantidade de folato são o fígado

bovino, vegetais verdes folhosos e algumas sementes oleaginosas (ALBUQUERQUE et al., 2017; MOLL & DAVIS, 2017). O folato sofre degradação pelo calor, o que interfere negativamente para que quantidade recomendada de ingestão diária seja atingida. No Brasil, a ingestão diária recomendada é de 400µg para indivíduos adultos (ANVISA, 2004), enquanto na Europa, recomenda-se 330 µg para adultos e 600 µg para mulheres grávidas (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2014). Os valores estabelecidos para cereais em alguns outros países são 140 µg/100g (EUA), 220µg/100g (Chile), 180µg/100g (Costa Rica) e 150µg/100g (África do Sul) (ANVISA, 2004, 2017; CRIDER et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2016).

3.3. Produção de folato por bactérias lácticas

Algumas bactérias lácticas possuem a capacidade de produzir folato e outras vitaminas do complexo B, sendo a produção dependente da cepa e das condições de pH, temperatura e presença de outras bactérias no mesmo ambiente (LEBLANC et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2017). Estudo recente de Laiño et al, 2017, avaliou a produção de folato por cepas de *Streptococcus thermophilus* em diferentes condições, observando que a produção da vitamina a 42°C foi 40% mais alta que a produzida a 37°C, tanto em pH 5 quanto em pH 6. Em pH 6, a biossíntese de folato foi 2 a 3 vezes maior do que em outros valores de pH. O efeito do pH sobre a produção de folato também foi observado por Divya et al., (2015), que avaliaram duas cepas de *Lactococcus lactis subs. lactis*, em leite desnatado (*skim milk*) com pH 5,0 e em sorvete com pH 6,0, verificando que a produção de vitamina no sorvete com pH 6,0 ($222,06 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$) foi 37% maior do que no leite desnatado com pH 5,0 ($162,23 \pm 1,8 \mu\text{g/L}$). Também Sybesma et al., 2003, mostraram o efeito do pH sobre a produção de folato por uma cepa de *Streptococcus thermophilus*.

A influencia do pH na produção de folato pode ser atribuída à expressão de alguns genes importantes na biossíntese. Laiño et al, 2017, observaram que em pH controlado 6,0 e após 6h, quando as cepas de *Streptococcus thermophilus* atingiram a fase estacionária, houve uma *up* regulação da expressão dos genes *folE*, *folQ*, *folK* e *folP*, envolvidos na síntese *de novo* de folato. Dados da literatura mostram que o pH 7,0 é o ótimo para a maioria das enzimas envolvidas na

biossíntese da vitamina, e que existe uma correlação direta entre a multiplicação microbiana e a produção da vitamina. A temperatura, quando adequada para a multiplicação microbiana, afeta positivamente a expressão dos genes relacionados à síntese de folato (LAIÑO et al, 2017).

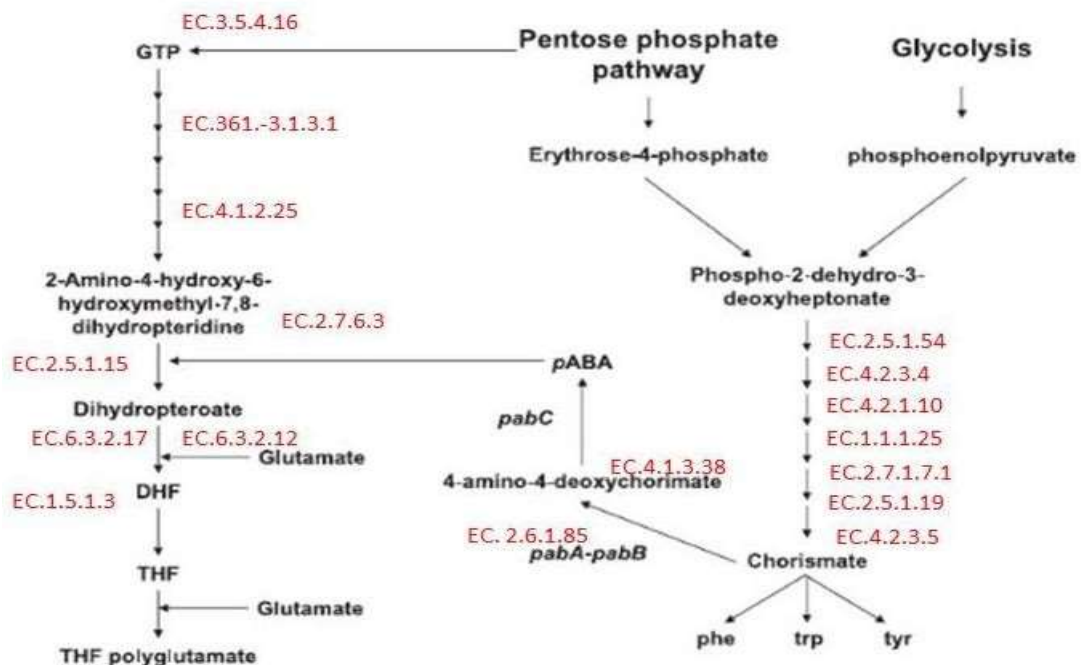
O Quadro 1 apresenta um resumo dos principais estudos sobre produção de folato por diferentes cepas de bactérias lácticas em diferentes condições.

Quadro 1 - Estudos sobre produção de folato por diferentes cepas de bactérias lácticas

Referencia	Objetivo do estudo	Condições testadas	Folato total produzido
Albuquerque et al., 2017, Brasil	Produção de folato por duas cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite de soja após 24h	<i>St. thermophilus</i> ST-M6	837 ± 56 ng/mL
		<i>S. thermophilus</i> TH-4	773 ± 89 ng/mL
Meuci et al., 2017, Itália	Produção de folato por duas cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite após 6h	<i>S. thermophilus</i> 439	69 ± 0,1 ng/mL
		<i>St. thermophilus</i> 908	76 ± 3,29 ng/mL
Lãino et al., 2017, Argentina	Produção de folato por <i>Streptococcus thermophilus</i> CRL803 em diferentes pH	pH 6,0	240 ± 14 ng/mL
		pH 5,0	148 ± 9 ng/mL
Divya & Nampoothiri, 2015, Índia	Produção de folato por <i>Lactococcus lactis</i> CM22 e <i>Lactococcus lactis</i> CM28 em leite desnatado e sorvete após 15h, encapsuladas e não encapsuladas	Encapsulamento em alginato e manitol	162,23 ± 1.8 ng/mL (<i>Lactococcus lactis</i> CM22, não encapsulada, em leite desnatado)
			222,06 ± 2.1 ng/mL (<i>Lactococcus lactis</i> CM22, não encapsulada, em sorvete)
Lãino et al., 2014, Argentina	Produção de folato por diferentes espécies e cepas de <i>Lactobacillus</i> e em co-cultura com culturas starter de iogurtes	<i>Lb. amylovorus</i> CRL 887 em FACM	81,2 ± 5,4 ng/mL
		<i>Lb. amylovorus</i> CRL887 em co-cultura com <i>St. thermophilus</i> em iogurte	263 ± 12 ng/mL
Iyer et al., 2010, Índia	Análise do potencial probiótico de duas cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> produtoras de folato	<i>St. thermophilus</i> RD102	48 ng/mL
		<i>St. thermophilus</i> RD104	44 ng/mL
Sybesma et al., 2003, Holanda	Produção de folato por <i>St. thermophilus</i> e <i>Lactococcus lactis</i> em diferentes pH	pH 6,5	534 ng/mL
		pH 6,0	386 ng/mL
		pH 5,5	142 ng/mL

A produção de folato por microrganismos ocorre por uma complexa via de biossíntese chamada folato *de novo*, que necessita dos precursores guanina trifosfato (GTP), também precursor da biossíntese de riboflavina e ácido para-aminobenzóico (pABA) para a síntese do poliglutamato de tetrahydrofolato (THF) (WEGKAMP et al., 2007). A via folato *de novo*, consiste na síntese de um anel de pterina a partir do GTP, que é condensado com pABA, sintetizado a partir do chorismato, e a adição de uma cadeia de glutamato (REVUELTA et al., 2018). A biossíntese do folato está apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Esquema da biossíntese de folato (Wekamp et al, 2007)



3.4. Biodisponibilidade do folato e do ácido fólico

Biodisponibilidade de um determinado componente alimentar pode ser definida como a proporção desse componente que é absorvida pelo organismo e atinge a circulação sistêmica. A biodisponibilidade depende de dois fatores: a bioacessibilidade, que se refere à proporção do componente alimentar que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal em forma absorvível e a bioconversão, que é a fração do componente convertido para a forma ativa. A bioeficácia corresponde à soma da biodisponibilidade e bioconversão (MARZE, 2017).

A biodisponibilidade do folato natural produzido por BAL e do ácido fólico sintético podem diferir, sendo que a do folato natural pode ser prejudicada pela cadeia de poliglutamatos presente em sua estrutura (MCKILLOP et al., 2006; LEBLANC et al, 2007). Estima-se que a biodisponibilidade do folato seja 50% da apresentada pelo ácido fólico, mas ainda há muita divergência de resultados, podendo variar de 10% a 98%, dependendo da metodologia de avaliação (SCAGLIONE & PANZAVOLTA, 2014). Tais diferenças podem ser atribuídas à heterogeneidade da população avaliada, duração dos estudos, composição da matriz alimentar ou da refeição, uso de material de referencia não certificado e desigualdades metabólicas das diferentes formas de folato, principalmente em relação à pós-absorção e cinética plasmática (WINKELS et al, 2007; OHRVIK & WITTHOFT, 2011, SCAGLIONE & PANZAVOLTA, 2014).

A absorção de folato dietético é distinta da apresentada pelo ácido fólico. A absorção do folato se inicia com a ação da enzima folilpoli-gama-glutamato carboxipeptidase (FGCP), presente no bordo em escova do epitélio intestinal, que hidrolisa os poliglutamatos em monoglutamatos, que são subsequentemente absorvidos no intestino por mecanismos passivos ou por transportadores. No caso do ácido fólico, ocorre um processo mais complexo no enterócito, onde o ácido fólico é inicialmente reduzido a dihidrofolato e tetrahidrofolato pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR), e em seguida esses folatos hidrolisados são convertidos em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), que é a forma ativa no organismo. O 5-MTHF é transferido para a veia mesentérica através de uma proteína e internalizado nas células epiteliais por várias proteínas receptoras de folato. Uma preocupação crescente que vem sendo investigada em diversos estudos é o ácido fólico não metabolizado (AFNM) na corrente sanguínea da população, que ocorre devido a alguns polimorfismos nos genes que codificam a enzima DHFR e a saturação dessa enzima (SAINI et al., 2016; MOAZEN et al., 2017; REES et al., 2017). O pH intestinal exerce papel importante na absorção, pois as enzimas responsáveis pela hidrólise do folato tem atividade ótima em pH 6-7. Alimentos ou medicamentos que alteram o pH intestinal podem alterar a biodisponibilidade do folato, assim como outros fatores, como presença de antagonistas de folato, alterações morfológicas e funcionais intestinais, e taxa de esvaziamento gástrico (LEBLANC et al. 2007). Neste contexto, destaca-se o estudo de Eitenmiller e Landen, (1999), que observaram que a absorção de folato no intestino delgado aumenta quando está ligado às proteínas do

leite.

Em relação a esse tema, um dado importante relatado por Laiño et al., (2015) foi que a administração de leite fermentado bio-enriquecido com folato a ratos não somente melhorou o *status* de folato dos animais, mas também foi capaz de prevenir a deficiência dessa vitamina.

3.5. Fortificação com ácido fólico

No Brasil, a fortificação obrigatória de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico teve início em 2002, concomitante à Argentina e posteriormente à implantação em outros países, como Canadá, Estados Unidos. A legislação foi atualizada em 2017, quando foi estabelecido um limite máximo de adição ($220\mu\text{g}/100\text{g}$), inexistente na legislação anterior, na qual havia apenas um limite mínimo de adição ($150\mu\text{g}/100\text{g}$). A recente alteração na legislação demonstra a preocupação das autoridades governamentais de saúde em relação ao consumo excessivo do ácido fólico. Nos EUA, o programa em vigor estabelece valor semelhante ao Brasil ($140\mu\text{g}/100\text{g}$ em farinhas de cereais em geral). Outros países que também aderiram à fortificação obrigatória são Chile ($220\mu\text{g}/100\text{g}$), Costa Rica ($180\mu\text{g}/100\text{g}$) e África do Sul ($150\mu\text{g}/100\text{g}$) (ANVISA, 2004, 2017; CRIDER et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Apesar dos benefícios alcançados pela adoção da fortificação mandatória, alguns fatores negativos advindos da ingestão excessiva de ácido fólico geram grande preocupação. Muitos países, como Itália, Finlândia e França, não adotaram o programa de fortificação mandatória devido a seus efeitos indesejados, mas recomendam uma dieta balanceada e rica em folato, principalmente para mulheres em idade reprodutiva (POUNIS et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016). Um dos principais problemas é que o excesso de ácido fólico mascara a deficiência de vitamina B12, outra vitamina do grupo B muito importante, cuja deficiência causa anemia megaloblástica, além de danos neurológicos. O diagnóstico tardio da deficiência de vitamina B12 pode estar relacionado com danos neurológicos irreversíveis (PAUL & SELHUB, 2017).

Além disso, a elevada ingestão de ácido fólico parece estar associada com

alguns tipos de câncer, embora isso não esteja ainda bem esclarecido. Smith et al., 2008, concluíram que o ácido fólico pode proteger o organismo contra o início do câncer mas também pode facilitar o crescimento de células pré-neoplásicas. Segundo esses autores, não se sabe exatamente quais outros processos biológicos podem ser afetados por concentrações elevadas de folato, embora esteja claro que a ingestão excessiva e indiscriminada através da fortificação/suplementação tem causado aumento nas taxas plasmáticas de folato e de ácido fólico não metabolizado na população (SMITH et al., 2008). No entanto, uma meta-análise realizada por Moazzen et al., 2017, indicou não haver correlação significativa entre suplementação/fortificação de ácido fólico e risco de câncer colo-retal.

Apesar dos aspectos negativos da fortificação/suplementação, não é possível ignorar a importância desta vitamina para o organismo humano e principalmente para mulheres grávidas. Alguns estudos indicam que é possível aumentar o nível de folato nos alimentos utilizando bactérias lácticas, já utilizadas pela indústria alimentícia para outras finalidades (LEBLANC et al., 2008, 2011; LÃINO et al., 2012, 2015; ALBUQUERQUE et al, 2016; SAUBADE et al, 2016). Pacheco et al., 2016, observaram que algumas cepas de *Streptococcus thermophilus*, isoladas de leite e produtos lácteos caprinos, foram capazes de aumentar em até seis vezes a quantidade de folato presente no leite de cabra fermentado com essas cepas.

Os dados existentes sobre biofortificação de alimentos empregando BAL produtoras de folato natural são bastante promissores, pois o folato produzido por essas bactérias *in situ* é natural, e os efeitos adversos do ácido fólico sintético podem ser evitados. O processo de produção dessa vitamina em alimentos através da fermentação por bactérias lácticas é de baixo custo e baixa complexidade, sendo de interesse para a indústria alimentícia, que poderá agregar valor aos seus produtos, e também para o consumidor, que poderá ingerir um alimento nutritivo, de baixo custo e naturalmente fortificado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção das cepas

O estudo foi desenvolvido com cinco cepas de *Streptococcus thermophilus* (34v, 170v, 268v, 341pc e 361v) e uma cepa de *Lactobacillus plantarum* (16cv),

isoladas de produtos caprinos, pertencentes a biblioteca de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, anteriormente comprovadas como produtoras de folato em leite de cabra (PACHECO et al., 2016). A cepa *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* NCIB 10463, dependente de folato para multiplicação (O'Brien et al., 2001) e resistente ao cloranfenicol (>500µg/ml), foi usada como indicadora da presença de folato no material em teste. A cepa foi cedida pelo Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc, do Centro de Referência de Lactobacilos (CERELA), Tucuman, Argentina.

4.2. Determinação do folato produzido pelas cepas de *St. thermophilus* e *Lb. plantarum* em meio de cultura

As cepas de *St. thermophilus* e *Lb. plantarum* foram inoculadas separadamente em 3 mL de caldo Hogg-Jago Glucose (HJG) (Blomqvist et al., 2006) e MRS (Merck™, Alemanha) respectivamente, e incubadas a 37°C por 24h. Uma alíquota de 1mL de cada cultura foi centrifugada (Sigma Aldrich™, Alemanha) a 10000 x g por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Os pellets de células remanescentes foram lavados três vezes em solução salina esterilizada (0,85%) e ressuspensos no mesmo volume de solução salina esterilizada. Uma alíquota de 120µL de cada suspensão obtida foi transferida para um tubo com 3 mL de caldo livre de folato (Folic Acid Casei Medium - FACM) (BD Difco, USA), incubando-se por 24h a 37°C. O procedimento foi repetido 3 vezes.

Para a obtenção do folato extracelular (EC), uma alíquota de 1,5 mL de cada uma das últimas suspensões foi centrifugada a 10000 x g por 5 min. Uma alíquota de 500µL do sobrenadante foi misturada com 500 µL de um tampão protetor, constituído de solução de acetato de sódio (0,82%) e ácido ascórbico (1%). O tampão protetor evita a oxidação e degradação do folato presente na suspensão. Para obtenção do folato intracelular (IC), o restante dos sobrenadantes foi descartado e as células remanescentes foram lavadas 3 vezes com solução salina esterilizada. Os pellets formados foram ressuspensos em 1mL de tampão protetor. Ambas suspensões (EC e IC) foram aquecidas em um termobloco (Accublock™, Labnet, Edison, USA) a 100°C por 5 min, resfriadas e centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até a determinação da

concentração de folato.

A concentração de folato nas suspensões (EC e IC) foi determinada pelo método microbiológico, de acordo com Horne e Patterson (1988). A cepa NCIB 10463 foi inoculada em 3mL de caldo MRS, incubada a 37°C por 24h, e 1 mL desta cultura foi centrifugado a 100000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. Os pellets com as células foram lavados 3 vezes com solução salina esterilizada (0,85%) e ressuspensos em 1 mL da mesma solução. Em seguida, transferiu-se 120µL das suspensões para um tubo contendo 3 mL de caldo FACM, incubando-se por 24h a 37°C. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e a última cultura foi a utilizada para a determinação da concentração de folato. Da última cultura, foi retirada uma alíquota de 1mL, centrifugada a 100000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. As células remanescentes foram lavadas, repetindo-se a lavagem por 3 vezes. O pellet obtido foi ressuspenso em 1 mL de solução salina esterilizada e 480µL foram transferidos para um tubo contendo 12mL de caldo FACM dupla concentração, adicionando-se 24µL de uma solução de cloranfenicol a 20mg/mL.

As suspensões EC e IC foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em uma solução de tampão fosfato (0,1M, pH 6,7) de forma a obter uma suspensão com densidade óptica (DO) a 595nm dentro da faixa estabelecida em uma curva padrão construída com soluções de ácido fólico com concentrações entre 0,0 e 1,0 µg/L, preparadas em tampão fosfato 0,1M (pH 6,7). Alíquotas de 100µL das suspensões em tampão fosfato foram transferidas em triplicata para os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços, adicionando-se em seguida 100µL da suspensão contendo a cepa indicadora NCIB 10463. Após homogeneização das suspensões nos poços com uma pipeta, as placas foram incubadas a 37°C por 48h, protegidas da luz. Homogenizou-se novamente e efetuou-se a leitura da densidade óptica (DO) a 595 nm, empregando-se um leitor de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™, Waltham, USA). As concentrações de folato intracelular (IC) e extracelular (EC) foram calculadas com base na curva padrão, sendo a concentração de folato total obtida somando-se as concentrações de folato IC e EC, e os resultados foram expressos em ng/mL.

4.3. Determinação do folato produzido pelas cepas em estudo em leite bovino

Para avaliação da produção de folato pelas cepas em estudo em leite bovino utilizou-se leite em pó desnatado Molico™ (Nestlé, Brasil) reconstituído. As cepas foram ativadas, separadamente, em caldo HJG ou MRS para *St. thermophilus* ou *Lb. plantarum*, respectivamente, e incubadas a 37°C por 18h. Em seguida, uma alíquota de 1mL de cada cultura foi centrifugada a 10000 g x 5 min, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 1 mL de solução salina esterilizada ao pellet de células. Um volume de 2% (v/v) desta suspensão foi adicionado a 150ml de leite em pó reconstituído a 10% e pasteurizado no Thermomix (Vorwerk™, Alemanha) por 15 segundos a 75°C e posteriormente resfriado, de forma a atingir a população de 10⁵ UFC/mL. Os leites inoculados foram incubados a 37 °C por 24h, retirando-se alíquotas nos tempos 0, 6, 9, 12 e 24h para quantificação do folato, enumeração de bactérias viáveis (UFC/mL) e medida de pH.

Para a quantificação do folato no leite bovino contendo as cepas em teste, alíquotas de 500µl foram retiradas em cada tempo testado, e misturadas com 500µl de tampão protetor [solução de acetato de sódio (0,82%) e ácido ascórbico (1%)]. As misturas foram aquecidas a 100°C por 5min no termobloco Accublock. Após resfriamento, as misturas foram centrifugadas 100000 x g por 5 min e os sobrenadantes foram retirados armazenados a -20°C até a quantificação de folato. Para liberar o folato aderido às proteínas e/ou carboidratos do leite, foi realizado um tratamento trienzimático, conforme descrito por Iyer et al. (2009) e Lãino et al., (2015). Os sobrenadantes das culturas em teste, preparadas conforme descrito acima, foram tratados com as enzimas α-amilase de *Aspergillus oryzae* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), protease de *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), e folato desconjugase de plasma humano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). As enzimas foram diluídas em água destilada deionizada para obtenção da concentração de 4mg/mL. Primeiramente, adicionou-se 200µL de α-amilase a 1 mL de amostra, incubando-se por 2 horas a 37°C. A mistura foi aquecida a 100°C por 5 min em um termobloco (Accublock™, Labnet, Edison, USA) para inativação da enzima. A mistura foi então esfriada, adicionada de 200µL de protease, incubada por 3 horas a 37°C, aquecida por 5 min a 100°C e centrifugada

por 5 min a 8000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf estéril, adicionando-se 200 µL de plasma humano e incubando-se por 3 horas a 37°C. A mistura foi aquecida novamente em um termobloco por 5 min a 100°C e centrifugada por 5 min a 10000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos eppendorf estéreis e armazenados a -80°C.

A enumeração das bactérias viáveis em cada leite testado foi feita pelo método drop plate (NAGHILI et al., 2013). As alíquotas retiradas nos tempos 0, 6, 9, 12 e 24h foram submetidas a diluições decimais seriadas e uma gota de 10µL de cada diluição foi transferida para a superfície de placas de Petri com ágar M17(Difco) suplementado com lactose a 10%. As placas foram incubadas a 37°C por 24h em jarras de anaerobiose, efetuando-se a contagem das colônias na gota. Os resultados foram expressos em log UFC/mL, conforme fórmula abaixo:

$$\log \text{UFC/mL} = \log [n^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{diluição}^{-1}] \times 100$$

Para medir o pH dos leites nos tempos 0, 6, 9, 12 e 24h, empregou-se um potenciômetro (BEL Engineering, Milano, Itália). Foram realizadas três medições em cada tempo, calculando-se a média aritmética das 3 repetições.

4.4. Determinação do folato produzido pelas co-culturas de *St. thermophilus* e *Lb. plantarum*

4.4.1. Teste de difusão de poços para verificar incompatibilidade entre as cepas

Previamente à co-cultura, realizou-se um teste de incompatibilidade entre as cepas, utilizando-se o método de difusão em poços, como descrito por Lãino et al., (2014). Para isso, 70 µl de uma cultura de 18-24h de *St. thermophilus* ou *Lb. plantarum* foram inoculados em placas de petri contendo 10 mL de ágar M17 ou MRS, respectivamente. Após a solidificação, 30 µl de sobrenadante livre de células (SLC) das 5 cepas de *St. thermophilus* foram transferidos para poços de 5mm de diâmetros formados na placa de MRS contendo *Lb. plantarum*. O contrário também foi feito, ou seja, 10 µl do SLC de *Lb. plantarum* foram transferidos para poços de 5mm de diâmetro feitos em cada placa de M17 contendo as cepas de *St. thermophilus*. As placas foram incubadas a 37°C por 24h observando-se a formação

de halo de inibição, indicativo de incompatibilidade entre as cepas.

4.4.2. Co-cultura das cepas

Cada cepa de *St. thermophilus* (34v, 170v, 268v, 361v e 341pc) foi combinada separadamente com a cepa de *Lb. plantarum* (16cv), resultando em 5 combinações diferentes:

- A (*St. thermophilus* 34v + *Lb. plantarum*16cv);
- B (*St. thermophilus* 170v + *Lb. plantarum*16cv);
- C (*St. thermophilus* 268v + *Lb. plantarum*16cv);
- D (*St. thermophilus* 361v + *Lb. plantarum*16cv);
- E (*St. thermophilus* 341pc + *Lb. plantarum*16cv);

Inicialmente, as cepas foram ativadas separadamente em caldo HJG ou MRS para *St. thermophilus* ou *Lb. plantarum*, respectivamente, e incubadas a 37°C por 18h. Em seguida, uma alíquota de 1mL de cada cultura foi centrifugada a 10000 g x 5 min, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o pellet em 1 mL de solução salina esterilizada. Um volume de 1% de cada suspensão foi adicionado a 150ml de leite em pó Molico™ (Nestlé, Brasil), reconstituído a 10% e pasteurizado no Thermomix (Vorwerk™, Alemanha) por 15 segundos a 75°C e posteriormente resfriado. Os leites contendo as culturas foram incubados a 37°C por 24h, retirando-se alíquotas nos tempos 0 e 24h para quantificação de folato, aferição do pH e enumeração de células viáveis.

O processamento das amostras e a determinação do folato foram feitos conforme descrito no item 4.3., empregando-se ágar MRS e também M17 e a técnica drop plate (NAGHILI et al., 2013). A enumeração de células viáveis foi realizada nos dois meios de cultura e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.4.3. Fermentação do leite reconstituído em diferentes temperaturas e pH controlado

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida com leite bovino em pó desnatado

Svelty™ (Nestlé, Argentina), reconstituído a 10% epasteurizado no e com as cepas de *St. thermophilus* 34v e *Lb. plantarum* 16cv apenas.

Com o intuito de verificar a influência da temperatura e do pH na produção de vitamina durante a fermentação do leite, inicialmente testou-se 37°C e 42°C, sem controle de pH. Encontrada a melhor temperatura (42°C), realizou-se a fermentação em pH 6,0 em um fermentador 1,5 L Infors HT™ (Basel, Suíça), contendo 1,350 L de leite desnatado reconstituído e pasteurizado. Primeiramente a cepa de *St. thermophilus* 34v e a cepa de *Lb. plantarum* 16cv foram ativadas separadamente em caldo Laptg (1.5% peptona, 1% triptona, 1% extrato de levedura, 1% de glicose e 0.1% de Tween 80) e MRS, respectivamente, por 18-24h a 42°C, repetindo o procedimento de ativação mais uma vez. Alíquotas de 1 mL dos caldos ativados foram centrifugadas, lavadas com solução salina estéril, ressuspensas no mesmo volume em solução salina estéril e inoculadas 10% em meio de cultura a 42°C por 18h-24h. As culturas obtidas foram centrifugadas 10000 g x 5 min, lavadas com solução salina estéril, ressuspensas no mesmo volume em solução salina estéril e inoculadas em 150 mL de leite bovino pasteurizado na proporção de 5% de *St. thermophilus* e 5% de *Lb. plantarum*, que foi incubado a 42°C por 24h. O leite fermentado assim obtido foi utilizado como iniciador da fermentação no fermentador, que foi realizada a 42°C por 24h, com agitação de 70 rpm. O pH do leite foi mensurado no início do experimento (6,6) e foi automaticamente mantido em 6 durante toda a fermentação com uma solução estéril de NaOH 10M. Paralelamente, foram realizados os seguintes experimentos controle:

- S2: leite fermentado em shaker a 42°C, com agitação de 70 rpm por 24h;
- E2: leite fermentado em estufa a 42°C por 24h, sem agitação;
- CN: leite sem culturas, mantido a 42°C na estufa (controle negativo).

Nos tempos 0h e 24h, foram retiradas amostras de todos os tipos de leites, que foram submetidas à enumeração de células viáveis e quantificação de folato, conforme já descrito no item 4.3. Esta etapa do trabalho foi realizada na Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI), em San Miguel de Tucuman, Argentina.

4.5. Avaliação da biodisponibilidade do folato produzido nos leites fermentados

Os testes de biodisponibilidade do folato produzido nos leites fermentados foram realizados de acordo com Laiño et al., 2015, empregando-se camundongos Balb/c e o modelo depleção-repleção (14 dias de depleção e 21 dias de repleção). Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA), em San Miguel de Tucuman, Argentina. Os protocolos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CERELA (CRL-BIOT-LT-2014-1A), adotando-se as recomendações da Federation of European Laboratory Animal Science Associations e da Asociación Argentina para la Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio.

4.5.1. Alimentação dos animais

Os animais foram alimentados com 2 tipos de ração, cuja composição está descrita na Tabela 1.

1. Folic Acid Deficient Diet (FADD) (AIN-93G Purified Rodent Diet without Folate, with Vitamin Free Casein Cat. N°116765, Dyets, Bethlehem, PA, USA);
2. FADD suplementado com ácido fólico 4mg/kg (dieta controle) (AIN-93G Purified Rodent Diet with Vitamin Free Casein Cat. N° 111134, Dyets, Bethlehem, PA, USA).

As rações foram ofertadas aos animais *ad libidum*, medindo-se a quantidade ingerida a cada dois dias, através da pesagem da quantidade de ração restante.

Tabela 1 - Composição das rações (Dyets, Bethlehem, USA).

Composição	g/kg de ração	
	Controle	Deficiente
L-Alanina	3,5	3,5
L- Arginina (base livre)	11,2	11,2
L- Asparagina.H2O	6,82	6,82
L- Acido Aspártico	3,5	3,5
L- Cisteína	3	3
L-Acido Glutâmico	35	35
Glicina	23,3	23,3
L-Histidina	3,3	3,3
L-Isoleucina	8,2	8,2
L-Leucina	11,1	11,1
L-Lisina-HCl	18	18
L- Metionina	8,2	8,2
L-Fenilalanina	11,6	11,6
L-Prolina	3,5	3,5
L-Serina	3,5	3,5
L- Treonina	8,2	8,2
L- Triptofano	1,74	1,74
L-Tirosina	3,5	3,5
L-Valina	8,2	8,2
Dextrina	397	397
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Azeite de soja	70	70
Mix de minerais #210025	35	35
Acetato de Sódio	8,1	8,1
Mix de vitaminas #317759 (livre de ácido fólico e riboflavina)	10	10
Riboflavina Premix (1mg/g)	7	7
Pré mistura Ácido Fólico/Sacarose	2	-
Cloridrato de Colina	2	2

4.5.2. Preparo dos leites experimentais para alimentação dos animais

Foram preparados três tipos de leite:

1. Leite fermentado bioenriquecido (BFM), ou seja, leite fermentado com a combinação das cepas *St. thermophilus* 34v + *Lb plantarum* 16cv, em pH controlado 6,0 a 42°C por 24 horas, condições selecionadas para produção máxima de folato ($321,1 \pm 14,3$ ng/mL);
2. Leite não fermentado (UM), ou seja, apenas leite reconstituído e pasteurizado;
3. Leite reconstituído, pasteurizado e não fermentado (UMFA), acrescido de ácido fólico (Sigma Aldrich, Alemanha) em concentração similar a presente no leite BFM (300 ng/mL).

O leite BFM foi preparado em um fermentador 1,5 L Infors HT™ (Basel, Suíça), conforme descrito no item 4.5.3. Vinte e uma amostras de 50mL do leite BFM foram transferidas para frascos descartáveis estéreis e congeladas a -20°C. Os outros dois tipos de leite foram produzidos no mesmo dia, e 21 amostras de cada tipo foram também transferidas para frascos descartáveis estéreis e congeladas a -20°C. A cada 7 dias de armazenamento, as amostras de cada tipo de leite eram previamente descongeladas em um refrigerador e alíquotas de 1 mL eram retiradas para quantificação do folato, conforme descrito no item 4.3.

No dia anterior à alimentação dos animais, as amostras de leite foram descongeladas em um refrigerador. Diariamente, ofertou-se 50 mL dos leites a cada grupo experimental, para consumo *ad libitum*.

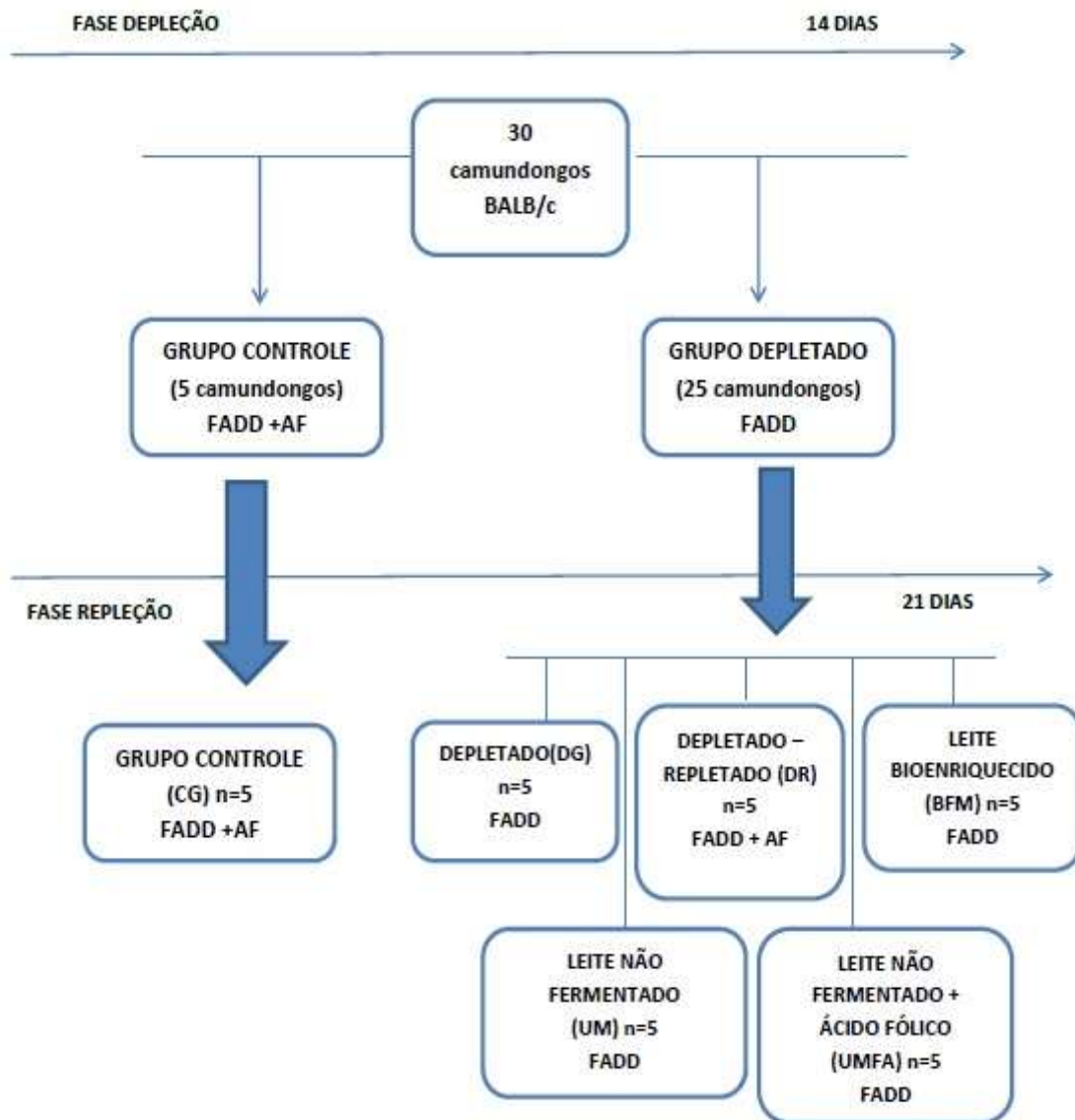
4.5.3. Modelo experimental para avaliação da biodisponibilidade do folato nos leites fermentados

Os testes foram realizados conforme protocolo de Lãino et al., (2015), e apresentado na Figura 3. Trinta camundongos da raça BALB/c, machos, adultos e com 3 semanas de idade, receberam, durante 14 dias, ração sem ácido fólico, correspondente à “fase de depleção”. Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, de 5 e 25 animais, formando o grupo controle e o grupo depletado, respectivamente. O grupo controle, recebeu somente a ração FADD suplementada com ácido fólico durante todo o experimento. Os 25 animais do

grupo depletado foram subdivididos em 5 grupos de 5 animais cada, conforme segue:

1. Grupo “depletado” (DG), formado por camundongos que receberam somente a ração FADD;
2. Grupo “depletado-repletado” (DR), formado por camundongos que receberam a ração FADD adicionada de ácido fólico;
3. Grupo “leite bioenriquecido” (BFM), formado pelos animais que receberam a ração FADD e leite fermentado bioenriquecido com folato produzido pelas combinações das cepas *St. thermophilus* 34v + *Lb plantarum* 16cv.
4. Grupo “leite não fermentado” (UM), formado pelos animais que receberam a ração FADD e leite não fermentado (apenas reconstituído e pasteurizado);
5. Grupo “leite não fermentado adicionado de ácido fólico” (UMFA), formado pelos animais que receberam a ração FADD e leite não fermentado adicionado de ácido fólico;

Figura 3 - Modelo experimental depleção-repleção.



4.5.4. Preparo das amostras de órgãos e sangue para análise

Após o período de experimento (35 dias), os animais foram anestesiados com uma injeção de cetamina (Holliday, Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) com xilazina (Rompun, Bayer S.A., Buenos Aires, Argentina), de forma a atingir a concentração final de 2 $\mu\text{L/g}$ e 0,25 $\mu\text{L/g}$ por kg de peso dos camundongos, respectivamente. Os camundongos foram sacrificados por punção cardíaca e o sangue foi transferido para tubos eppendorf contendo ácido etilenodiaminatetracético (EDTA, anticoagulante) 0,5 M. Imediatamente após o sacrifício, os tubos foram incubados por 30 min a 37°C, separando-se o plasma do soro por centrifugação (1500 x g por 10 min). Os soros foram enviados para o Laboratorio de Analisis Clinicos y

Microbiologicos, San Miguel de Tucuman, Argentina, para determinação de glóbulos vermelhos totais (RBC), leucócitos, linfócitos, neutrófilos, hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), plaquetas, eosinófilos e monócitos.

Para a quantificação do folato dos eritrócitos, 100 µL de sangue foram diluídos em 900 µL de água destilada e incubados a 37° por 2h para ação da enzima desconjugase presente no sangue e consequente liberação do folato das cadeias de poliglutamatos. A mistura foi aquecida em um termobloco a 100°C por 5 min, centrifugada (13000 x g por 10 min) e o sobrenadante transferido a outro tubo, que foi congelado a -20°C até a quantificação do folato. As amostras do plasma foram diluídas 10x com um tampão de proteção (tampão fosfato 0,1 M adicionado de 1,5% (m/v) de ácido ascórbico), aquecidas em um termobloco a 100°C por 5 min e centrifugadas (10000 x g por 5 min) e o sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior quantificação do folato.

O fígado, baço e rins dos camundongos foram removidos e transferidos para tubos contendo 9 volumes de tampão de proteção (tampão fosfato 0,1 M adicionado de 1,5% (m/v) de ácido ascórbico), triturados, homogeneizados (Homogeniser MSE, UK), aquecidos a 100°C por 5 min e centrifugados (13000 x g por 15 min). Os sobrenadantes foram transferidos a outros tubos e congelados até a quantificação do folato, conforme descrito por Lãino et al., 2015.

Os intestinos dos animais foram extraídos e o conteúdo intestinal foi removido com solução salina estéril (0,85%). Os intestinos vazios foram cortados em três partes (partes próximas ao duodeno, jejuno e íleo), que foram transferidas separadamente para tubos contendo solução de formol a 10% e submetidos à análise histológica, empregando-se um microscópio óptico (Carl Zeiss-Axio Scope.A1), com uma lente de ampliação 100x. As lâminas para análise histológica foram preparadas por um especialista do CERELA. As imagens foram analisadas empregando-se o software AxioVision Release 4.8, calculando-se a relação entre comprimento médio das vilosidades e profundidade média das criptas (5 medidas por animal).

4.5.5. Quantificação de folato das amostras de sangue e órgãos

As amostras de sangue e os órgãos foram descongelados, homogeneizados com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,7 e o folato foi quantificado pelo método microbiológico, já descrito no item 4.3.

4.6. Avaliação da segurança das cepas em estudo

4.6.1. Produção de bacteriocinas

As cepas em estudo foram testadas quanto a produção de bacteriocinas, utilizando-se o teste spot-on-the-lawn, descrito por Flemming et al (1975) e adaptado por Ivanova et al., (1998) utilizando-se quatro cepas de *Listeria monocytogenes* como indicadoras de atividade (ATCC 7644, 711, 637, 104). As cepas foram cultivadas em caldo HJG ou MRS para *St. thermophilus* ou *Lb. plantarum*, respectivamente, por 24h a 37°C, centrifugadas a 10000 g X 8 minutos para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC). Em seguida, 10 µL de SLC foram transferidos para a superfície de quatro placas de Petri com ágar BHI (BD Difco™, USA), inoculado com cada uma das quatro culturas indicadoras de *Listeria monocytogenes* (1mL). As placas foram incubadas por 24h a 37°C e analisadas quanto à presença de um halo de inibição da cultura indicadora em volta do local onde o SLC foi colocado. Como nenhuma das cepas analisadas inibiu as cepas de *L. monocytogenes*, não foi necessário fazer testes adicionais para confirmação da produção de bacteriocinas.

4.6.2. Resistência à antibióticos

As cepas em estudo foram testadas quanto à resistência a antibióticos, empregando-se o método disco-difusão, de acordo com Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI, 2007). Foram utilizados 11 discos de antibióticos Sensifar™ (CEFAR, Brasil): ampicilina + sulfactam, cefuroxima, ceftiofur, cefotaxima ciprofloxacina, cotrimoxazol, enrofloxacina, gentamicina, levofloxacina, ofloxacina, e tetraciclina. Os resultados (resistente, sensível ou intermediário) foram baseados na formação de halos de inibição e interpretados de acordo com o recomendado pelo fabricante dos discos de antibióticos.

4.6.3. Presença de genes de virulência

A presença de genes de virulência (genes *gelE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *ace*, *hdc1*, *hdc2*, *tdc* e *odc*) nas cepas estudadas foi analisada empregando-se PCR simplex, de acordo com Moraes et al. (2016). As condições das reações estão descritas na Tabela 3, e os volumes utilizados foram: 5 µL de DNA a 100 ng/µL; 2 µL de cada primer a 10mM; 0,1 µL de GoTaq® Master Mixes e água ultrafiltrada para completar (3,3 µL). O DNA das culturas de *St. thermophilus* e *Lb. plantarum* foi extraído empregando-se o kit ZR Fungal/Bacterial DNA Kit. As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems® Veriti® 96 Well Thermal Cycler) e a revelação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%, 1,5 % e 2%, usando 1 kb DNA ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, EUA) e 100 bp DNA ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, EUA) como marcadores moleculares. As corridas foram realizadas a 100 V por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (89 nM Tris-Borato e 2 nM EDTA, pH 8.0). O gel foi corado com Syber™ Safe DNA Gel Stain (1 µL/10 mL, Invitrogen, EUA) e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta – 320 nm no aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR + Imaging System.

4.7. Análise estatística

Os resultados referentes às quantificações de folato em meio de cultura e em leite bovino foram expressos em média e desvio padrão, considerando as três repetições e as triplicatas realizadas. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA GLM, seguido de teste post-hoc de Tukey, empregando software minitab 17. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Os resultados das quantificações de folato nas amostras da fermentação em pH controlado 6,0 e os obtidos nos experimentos com os camundongos foram expressos em média aritmética e desvio padrão, considerando as triplicatas realizadas. Estes resultados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA GLM seguido de teste post-hoc de Tukey, empregando-se o software Minitab 17. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Tabela 2 - Primers utilizados e condições das reações de PCR.

Gene alvo	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Condições da reação
<i>efa A</i>	F: GCCAATTGGGACAGACCCTC R: CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	688	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 7 min
<i>asa 1</i>	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R:TAAGAAAGAACATCACCCACGA	375	20 µL, 94 °C por 4 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 7 min
<i>esp</i>	F: AGATTTTCATCTTTGATTCTTG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	20 µL, 94 °C por 4 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 43 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 7 min
<i>tdc</i>	F:GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCAR R:CCRTARTCNNGNATAGCRAARTCNTRTG	924	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 7 min
<i>hdc1</i>	F: AGATGGTATTGTTTCTTATG R:AGACCATACACCATAACCTT	534	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 40°C por 30 s, 72 °C por 2 min, 72 °C por 7 min
<i>odc</i>	F:GTNTTYAAYGCNGAYAARCANTAYTTYGT R: ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG	1446	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 54°C por 30 s, 72 °C por 2 min, 72 °C por 7 min
<i>cylA</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 52°C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 7 min
<i>ace</i>	F :GAATTGAGCAAAGTTCAATCG R: GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	1008	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 47°C por 1 min, 72 °C por 1min, 72 °C por 7 min
<i>gel E</i>	F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA	231	20 µL, 94 °C por 4min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 47°C por 1 min, 72 °C por 1min, 72 °C por 7 min
<i>cob</i>	F: AACATTCAGCAAACAAAGC R: TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1405	20 µL, 94 °C por 2min, a 44°C por 2 min, 72°C por 2 min, 35 ciclos 94 °C por 15 s, 44°C por 15s 72 °C por 15 s 72 °C por 5 min
<i>cpd</i>	F:TGGTGGGTTATTTTTCAATTC T R: T TACGGCTCTGGCTTACTA	782	20 µL, 94 °C por 2min, a 44°C por 2 min, 72°C por 2 min, 35 ciclos 94 °C por 15 s, 44°C por 15s 72 °C por 15 s 72 °C por 5 min

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação da concentração de folato EC e IC no meio de cultura sem folato (FACM) para verificar o potencial de produção da vitamina pelas cepas estudadas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de folato extracelular (EC), intracelular (IC) e folato total produzido pelas cepas estudadas, em meio FACM

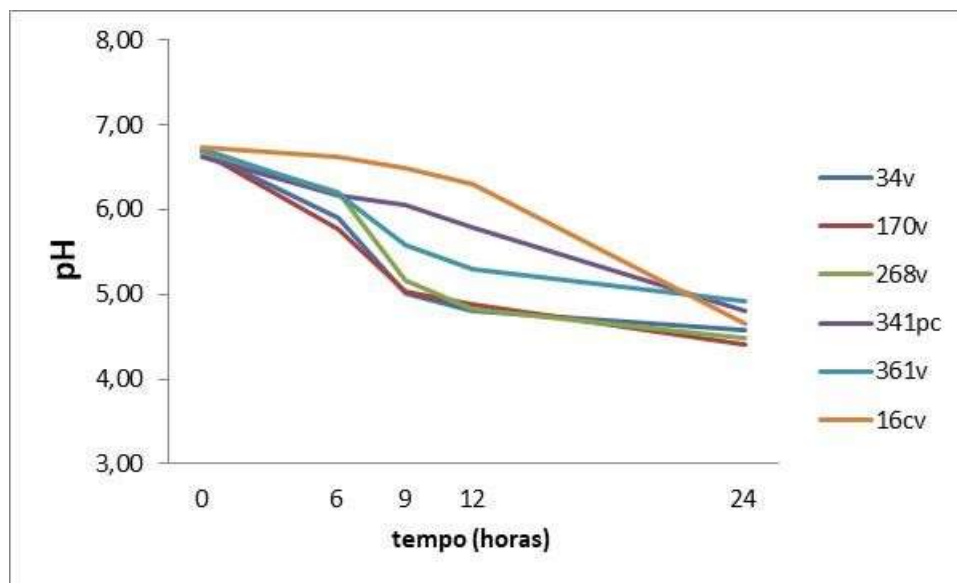
Cepa	Folato EC (ng/mL)	Folato IC (ng/mL)	Folato total (ng/mL)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 16cv	24,8 ± 6,5	271,7 ± 2,1	296,5
<i>Streptococcus thermophilus</i> 170v	157,3 ± 8,8	132,4 ± 3,3	289,7
<i>Streptococcus thermophilus</i> 268v	114,8 ± 9,3	88,4 ± 10,6	201,2
<i>Streptococcus thermophilus</i> 34v	97,7 ± 9,5	117,7 ± 9,4	215,4
<i>Streptococcus thermophilus</i> 341 pc	42,6 ± 3,6	46,5 ± 8,9	89,1
<i>Streptococcus thermophilus</i> 361v	59,3 ± 7,6	232,4 ± 7,1	291,7

As seis cepas estudadas foram boas produtoras de folato, como já havia sido reportado por Pacheco et al. (2016). A cepa de *Lactobacillus plantarum* foi a que produziu a maior quantidade de folato total (296,5 ng/mL) em meio FACM, seguida pela cepa *Streptococcus thermophilus* 361v (291,7 ng/mL). A cepa que produziu menos folato no meio FACM foi *Streptococcus thermophilus* 341pc. A semelhança dos resultados obtidos com os encontrados por Pacheco et al (2016) permite concluir que o congelamento a -80°C não afetou a capacidade das cepas em estudo produzirem a vitamina.

A queda do pH dos leites mantidos a 37°C contendo as cepas em estudo está indicada na Figura 4, onde é possível verificar que o pH inicial foi 6,68 ± 0,0 e

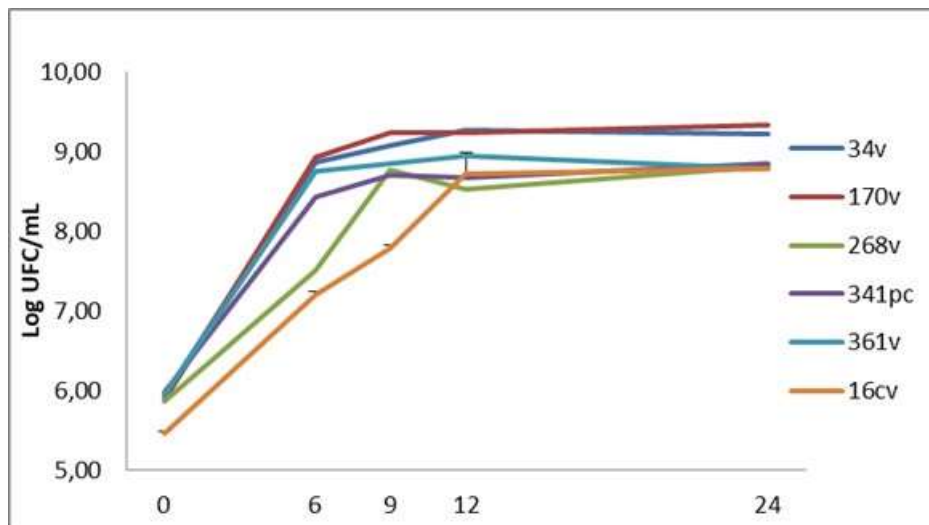
chegou a $4,64 \pm 0,2$ em 24h. Nota-se que *Lb. plantarum* 16cv apresentou maior lentidão na redução do pH, quando comparada às demais cepas. Enquanto as cepas de *St. thermophilus* reduziram consideravelmente o pH em 6h, a cepa *Lb. plantarum* 16cv demorou 12h para causar a mesma redução.

Figura 4 - Valores de pH dos leites contendo a cepas estudadas, nos tempos avaliados



As curvas de multiplicação das cepas estudadas durante a fermentação do leite a 37°C podem ser visualizadas na Figura 5. Observou-se que todas as cepas se multiplicaram bem no leite, atingindo a contagem de $9,0 \pm 0,2$ log UFC/mL em 24h.

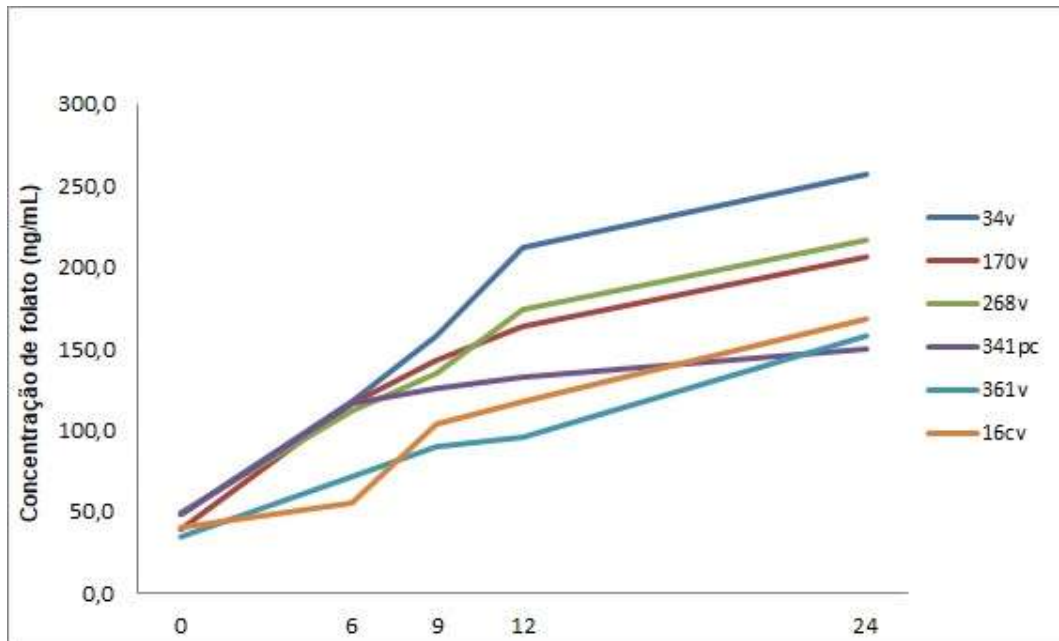
Figura 5 - Multiplicação das cepas estudadas no leite a 37°C



A concentração de folato produzido no leite bovino durante a fermentação a 37°C pelas cepas em estudo está apresentada na Figura 6. As Figuras 4, 5 e 6 indicam que a produção de folato foi mais alta no período de 0-6h para as cepas que melhor produziram a vitamina (34v, 170v, 341pc e 268v), período em que o pH estava $6 \pm 0,2$. Já para as cepas que produziram menos vitamina (361v e 16cv), o período de melhor produção foi 12-24h. A cepa de *Lb. plantarum* multiplicou-se mais lentamente que as demais cepas estudadas e conseqüentemente a redução do pH foi mais lenta, de modo que o pH chegou a 6 em 12h. Assim como observado por Meucci et al (2018) e Laiño et al (2012), verificou-se que a taxa de multiplicação diminuiu quando o pH se aproximou de 5. Dessa forma, foi possível estabelecer uma relação entre crescimento, pH e produção de vitamina.

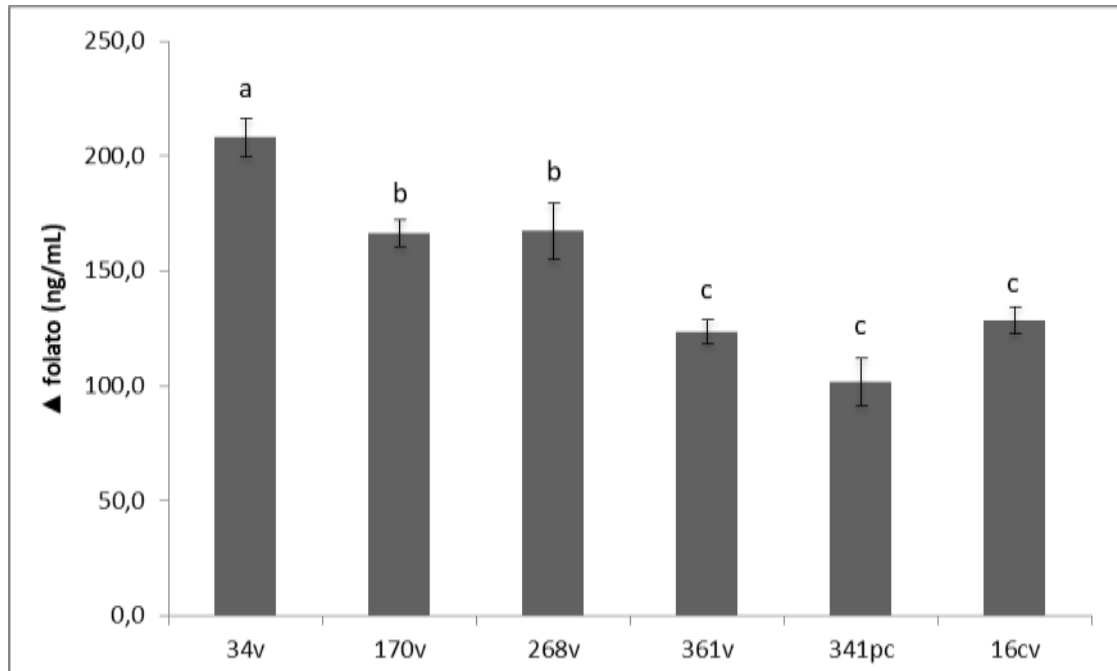
Pacheco et al (2016) já haviam relatado que as cepas estudadas eram boas produtoras de folato, tanto em meio FACM quanto em leite de cabra. A quantidade de folato produzida foi semelhante à observada neste estudo com leite bovino. A produção de folato no leite foi inferior à observada no meio FACM, o que sugere que a ausência de folato no meio favorece a sua síntese, embora alguns estudos tenham indicado que, para algumas cepas, a presença de folato não interfere na produção (Greppi et al, 2017; Lãino, Leblanc & Savoy de Giori, 2012).

Figura 6 - Produção de folato pelas cepas em estudo em leite



Diferentes autores relataram que a produção de folato por bactérias lácticas varia de acordo com a cepa e que a espécie *Streptococcus thermophilus* é considerada boa produtora, pois todos os genomas publicados mostram que a espécie possui os 6 genes necessários para a síntese de folato (MEUCI et al., 2017; LÃINO et al, 2017, CAPOZZI et al. 2012, IYER et al. 2010). Esta característica também foi observada no presente estudo, onde a quantidade produzida variou de acordo com a cepa, apesar de todas as cepas terem produzido folato. Dentre as 5 cepas de *St. thermophilus*, a que teve melhor produção de folato foi a cepa 34v ($208,1 \pm 8,4$ ng/mL) e a que apresentou menor produção foi a cepa 341 pc ($101,7 \pm 16,3$ ng/mL (Figura 7).

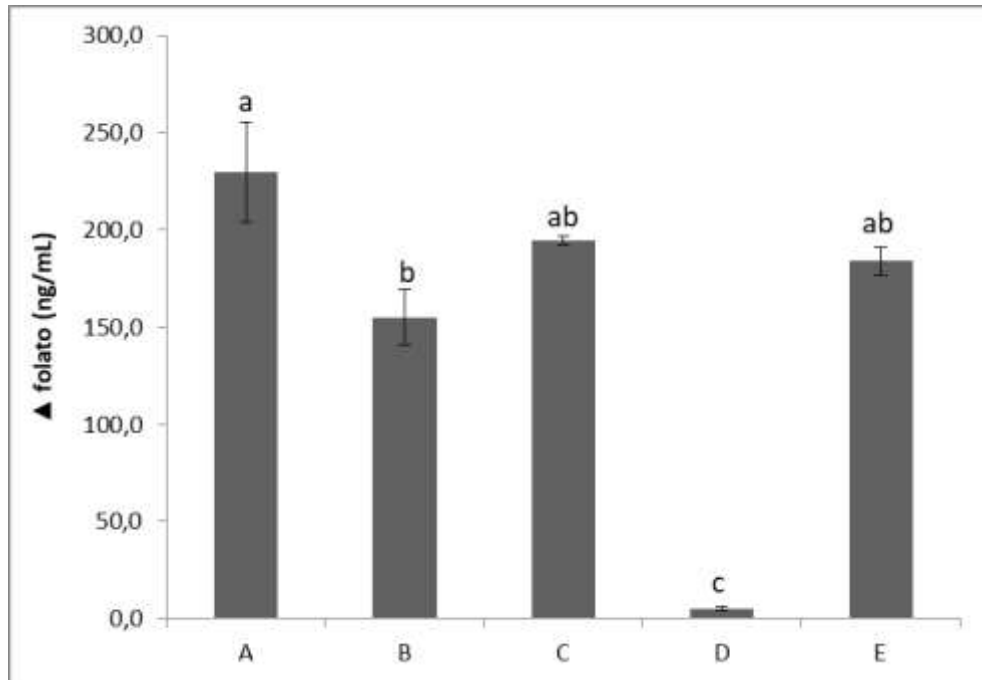
Figura 7 - Quantidade de folato produzido pelas cepas estudadas em leite a 37°C por 24h



O gênero *Lactobacillus* contém tanto cepas consumidoras quanto cepas produtoras de folato (GREPPI et al., 2017). A espécie *Lb. plantarum* é considerada produtora de folato, o que foi demonstrado neste estudo com a cepa 16cv, em leite bovino a 37°C ($128,7 \pm 10,6$ ng/mL). A quantidade de folato produzida por esta cepa foi superior à encontrada por Purwandani et al. (2018), que observaram que a cepa *Lb. plantarum* Dad-13 produziu $29,27 \pm 3,91$ ng/mL de folato em leite desnatado fermentado a 37°C por 18h. A maior produção encontrada para esta espécie (397 ± 60 ng/mL) foi reportada por Hugenschmidt, et al (2010).

O teste de difusão de poços indicou não haver incompatibilidade entre as cepas estudadas, permitindo que fossem combinadas. Na Figura 8 estão apresentados os resultados referentes a concentração de folato produzido pelas cinco combinações de cepas testadas.

Figura 8 - Concentração de folato produzida nas combinações de cepas A, B, C, D e E



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$). A: *St. thermophilus* 34v + *Lb. plantarum* 16cv; B: *St. thermophilus* 170v + *Lb. plantarum* 16cv; C: *St. thermophilus* 268v + *Lb. plantarum* 16cv; D: *St. thermophilus* 361v + *Lb. plantarum* 16cv; E: *St. thermophilus* 341pc + *Lb. plantarum* 16cv.

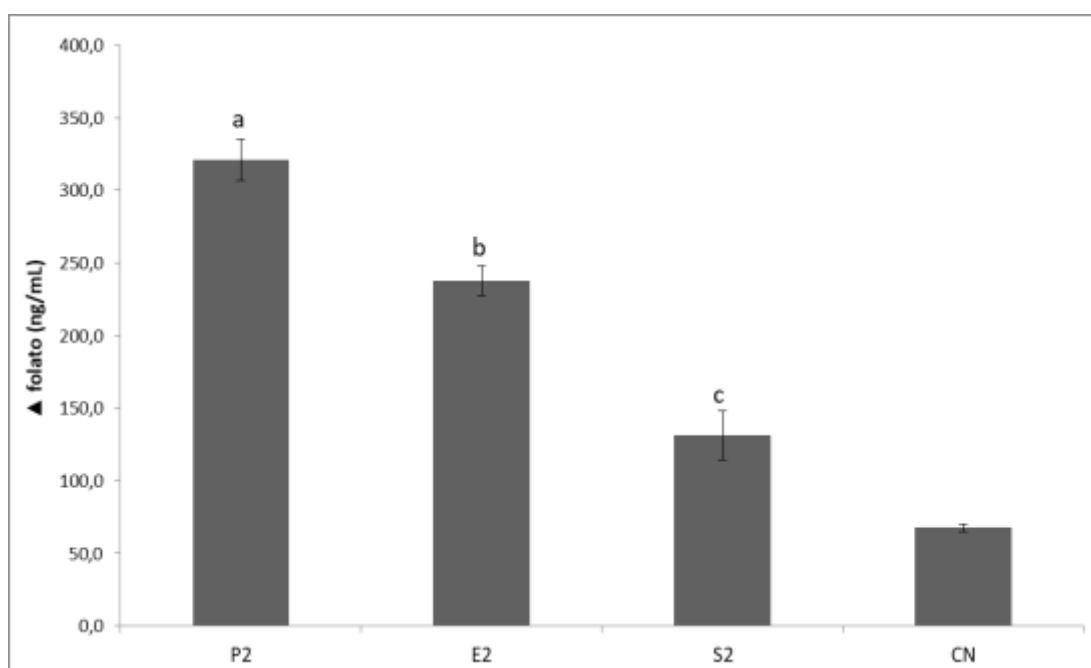
A combinação que apresentou o maior teor de folato foi a combinação **A** ($229,6 \pm 25,6$ ng/mL), seguida pela combinação **C** ($194,5 \pm 2,3$ ng/mL). A concentração de folato obtida pela combinação **D** foi de apenas ($5,3 \pm 0,9$ ng/mL), abaixo do produzido isoladamente por cada cepa. Tal resultado sugere que uma das cepas da co-cultura consumiu a vitamina produzida pela outra cepa. Tal resultado sugere que uma das cepas da co-cultura consumiu a vitamina produzida pela outra cepa. Este comportamento foi visto por Lãino et al., (2013), que verificaram que de quinze combinações diferentes de cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* testadas, duas resultaram em teor de vitamina mais baixo que de cada cultura isolada. Por outro lado, nas combinações **A**, **C** e **E**, as co-culturas resultaram em mais vitamina no leite em comparação à produção isolada por cada cepa. Aparentemente, houve uma simbiose entre as cepas, reforçando os achados de Albuquerque et al (2017), que reportaram aumento nos níveis de folato em um produto de soja fermentado resultante da combinação de *St. thermophilus* TH-4 com *Lactobacillus rhamnosus* LGG. Lãino, Leblanc e De Giori, (2012), que combinaram as cepas *St. thermophilus* CRL 803 e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 863, verificaram que a seleção

adequada de cepas produtoras de folato e a correta combinação entre elas em condições ótimas são capazes de gerar um produto com quantidade de folato suficiente para ser considerado como "boa fonte de folato" (180 ng/mL). Em relação ao crescimento, todas as cepas se multiplicaram bem, sem interferência de uma cepa sobre a outra. Notou-se um maior crescimento de *St. thermophilus* em todas as combinações, com contagem média inicial $5,7 \pm 0,2$ log UFC/mL subindo para $9,3 \pm 0,2$ log UFC/mL após 24h, enquanto que a cepa de *Lb. plantarum* chegou a $7,7 \pm 0,1$ log UFC/mL. O pH também reduziu da forma esperada em todas as combinações e alcançou o valor de $4,7 \pm 0,2$.

A combinação que resultou no maior teor de folato (A) foi então testada a 37°C e a 42°C. A fermentação a 42°C favoreceu a produção da vitamina, cuja concentração foi 20% maior ($246,1 \pm 11,7$ ng/mL) que a 37°C ($205,2 \pm 20,8$ ng/mL). Resultado semelhante foi encontrado por Laiño et al., (2017), que verificaram uma produção 40% maior de folato por cepas de *St. thermophilus* a 42°C em comparação a 37°C.

No presente estudo, a fermentação em pH controlado resultou em uma concentração de folato 35% ($321,1 \pm 14,1$ ng/mL) maior que em pH livre ($237,7 \pm 10,1$ ng/mL) (Figura 9).

Figura 9 - Concentração de folato produzido pela co-cultura A em pH controlado 6 e pH livre



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$). P2: amostra da fermentação das cepas *St. thermophilus* 34v + *L. plantarum* 16 cv em pH controlado 6,0; E2: leite fermentado em estufa a 42°C por 24h, sem agitação; S2: leite fermentado em shaker a 42°C, com agitação de 70 rpm por 24h; CN: leite sem culturas, mantido a 42°C na estufa (controle negativo).

Os achados deste estudo estão em concordância com trabalhos recentes sobre produção de folato por bactérias láticas, reforçando o conceito que o pH exerce fundamental papel na produção da vitamina, sendo o pH controlado 6.0 o mais apropriado para a fermentação. Lãino et al. (2017) encontraram que a produção era 2-3 vezes maior quando a fermentação ocorria em pH controlado 6, quando comparada com a fermentação em pH livre, observando uma up regulação da expressão dos genes *folE*, *folQ*, *folK* e *folP*, envolvidos na síntese de folato *de novo*. Além disso, dados da literatura mostram que o pH próximo a 7 é ótimo para a maioria das enzimas envolvidas na biossíntese da vitamina. Estudos de Divya et al (2015) e Lãino et al (2018) também encontraram aumento da produção em pH controlado 6. Em um estudo recém publicado, Lãino et al (2019) também reportaram uma clara influência do pH na produção de folato por *Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus* CRL 415. A fermentação em pH controlado 6.0 resultou em uma quantidade de folato 80% maior ($210 \pm 1 \mu\text{g/L}$) que a encontrada em pH livre ($116 \pm 3 \mu\text{g/L}$) e 28% maior que em pH controlado 5.0 ($163 \pm 1 \mu\text{g/L}$).

Notou-se também que a produção de folato durante a fermentação no shaker (S2) com agitação de 70 rpm foi mais baixa ($131,2 \pm 16,7 \text{ ng/mL}$) do que a observada na estufa ($237,7 \pm 10,1 \text{ ng/mL}$). Sabe-se que as bactérias láticas são microaerófilas e a aeração decorrente da agitação do shaker não favoreceu a produção da vitamina.

A concentração de folato nos leites BFM, UMFA e UM durante o período de armazenamento (7, 14 e 21 dias) manteve-se estável, com uma pequena perda não relevante. O congelamento a -20°C também não afetou a concentração do folato.

5.1. Avaliação da biodisponibilidade do folato produzido no leite reconstituído

Os animais consumiram, em média, $3,4 \pm 0,2\text{g}$ de ração por dia, não havendo diferença significativa de consumo entre os grupos ($p < 0,05$). Os camundongos

apresentaram peso médio inicial de $12,2\text{g} \pm 0,6$ e atingiram o peso final de $30,8\text{g} \pm 1,2$, não havendo diferença significativa de peso entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 4 apresenta os resultados do hemograma dos camundongos dos diferentes grupos testados. Os animais do grupo BFM apresentaram valores significativamente mais elevados ($p > 0,05$) para hemoglobina, glóbulos vermelhos e hematócrito que os animais dos demais grupos, sugerindo a bioeficácia do folato presente no leite. Os valores para estes animais foram mais elevados que os encontrados no grupo controle e os que receberam leite suplementado com ácido fólico (UMFA). Resultado semelhante foi encontrado por Leblanc et al. (2010), que utilizaram o mesmo modelo animal mas com tempo de depleção maior (30 dias). Estes autores observaram diminuição dos glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina no grupo depletado, sendo que o esfregaço sanguíneo indicou também ocorrência de anemia megaloblástica parcial. Em novo estudo, Laiño et al. (2015) não encontraram alterações hematológicas significantes quando utilizaram o mesmo modelo animal e tempo de depleção menor, de 14 dias.

Os resultados do hemograma sugerem que a ingestão do leite fermentado bioenriquecido com a forma natural da vitamina (BFM) foi mais bioeficaz no organismo animal que as outras formas testadas (CG, DR e UMFA), nas quais o ácido fólico foi suplementado. Bayes et al (2019) realizaram uma revisão de literatura sobre a biodisponibilidade das diferentes formas de folato, tanto em humanos quanto em animais, encontrando apenas 12 estudos, sendo que em apenas três foram obtidas diferenças estaticamente significativas, com maior biodisponibilidade da forma 5-MTHF. Esta forma é a principal produzida pelas BAL (HOLASOVÁ et al., 2005; MEUCCI et al., 2018) e a melhor absorvida pelo organismo. Embora no presente estudo as formas de folato produzido pelas BAL não tenham sido avaliadas, acredita-se que a principal tenha sido 5-MTHF, o que explica os resultados encontrados no hemograma, que indicou que o grupo suplementado com a forma natural da vitamina (BFM) apresentou resultados significativamente melhores que os grupos que utilizaram ácido fólico (controle, depletado-repletado e leite fermentado com ácido fólico).

Tabela 4 - Hemograma dos camundongos dos diferentes grupos testados.

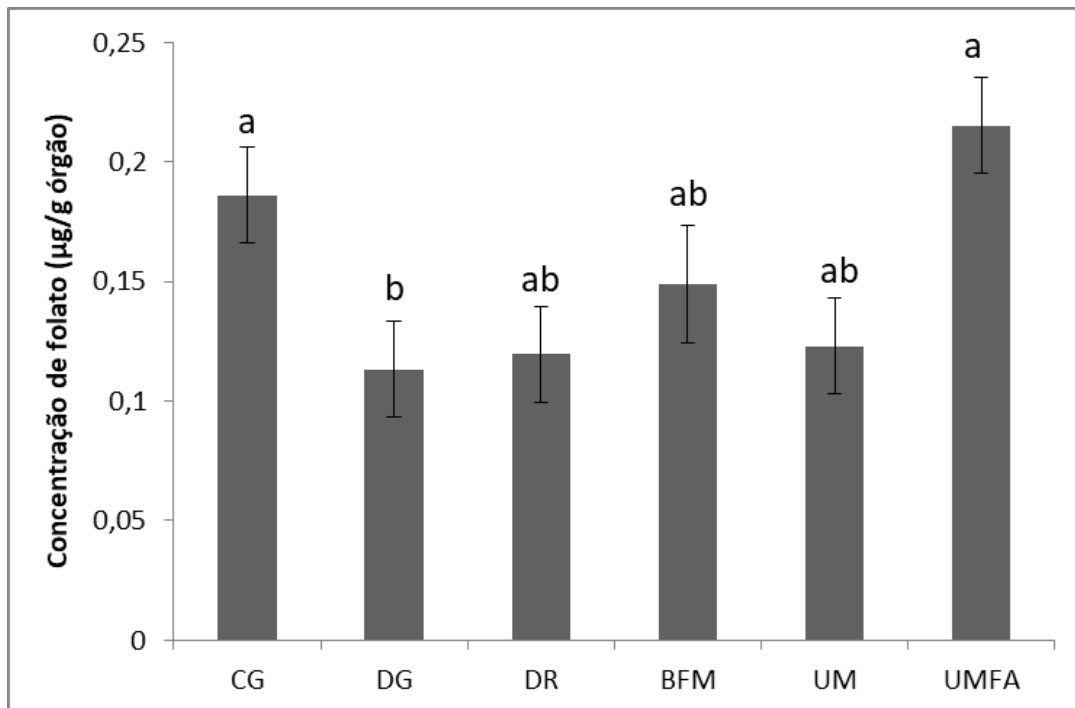
Grupos	Glóbulos vermelhos	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Hb	Htc	VCM	HCM	CHCM	Plaquetas
	$10^6/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	g/dL	%	fL	pg	g/dL	$10^5/\mu\text{L}$
CG	6,8± 0,6 ^{ab}	4,0± 0,8 ^a	3,1±0,7 ^a	0,8±0,15 ^{ab}	11,5±0,4 ^{ab}	32,0±3,0 ^{ab}	47,0±1,5 ^a	16,9±1,1 ^a	36,0 ±2,2 ^a	2,2±0,2 ^a
DG	6,6± 0,5 ^b	2,4±0,3 ^{ab}	1,9±0,3 ^{ab}	0,4±0,01 ^b	10,8±0,8 ^b	31,2±2,8 ^{ab}	45,8±0,7 ^a	16,3±0,4 ^a	35,6 ±1,5 ^a	2,0±0,3 ^a
DR	6,9± 0,3 ^{ab}	2,4±0,3 ^{ab}	2,0±0,2 ^{ab}	0,4±0,06 ^b	11,2±0,4 ^b	31,3±0,8 ^{ab}	45,9±0,9 ^a	16,4±0,5 ^a	35,7 ±0,9 ^a	2,0 ±0,2 ^a
BFM	7,4 ±0,4 ^a	2,7 ± 0,8 ^{ab}	2,0 ± 0,6 ^{ab}	0,7±0,02 ^{ab}	12,4 ±0,7 ^a	33,4 ±1,5 ^a	46,1 ±1,8 ^a	16,8 ±1,2 ^a	36,5 ±1,1 ^a	2,0 ± 0,2 ^a
UM	6,6 ±0,4 ^b	2,3 ± 0,8 ^b	1,8 ± 0,7 ^b	0,5 ±0,01 ^b	11,2 ±0,3 ^b	31,4±2,1 ^{ab}	47,6 ±1,1 ^a	17,2 ±0,6 ^a	36,1 ±1,3 ^a	2,1 ± 0,3 ^a
UMFA	5,9 ±0,3 ^b	2,9 ± 1,4 ^{ab}	1,8 ± 0,8 ^{ab}	1,1±0,01 ^a	10,2±0,9 ^b	27,0± 1,5 ^b	46,6 ±0,3 ^a	17,0 ±0,7 ^a	36,6 ±1,5 ^a	1,7 ± 0,2 ^a

Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$). HB: hemoglobina; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média. CG: grupo controle; DG: grupo depletado; DR: grupo depletado-repletado; BFM: leite fermentado bioenriquecido; UM: leite não fermentado; UMFA leite não fermentado + ácido fólico.

5.1.1. Concentração de folato no fígado, baço e rins dos camundongos

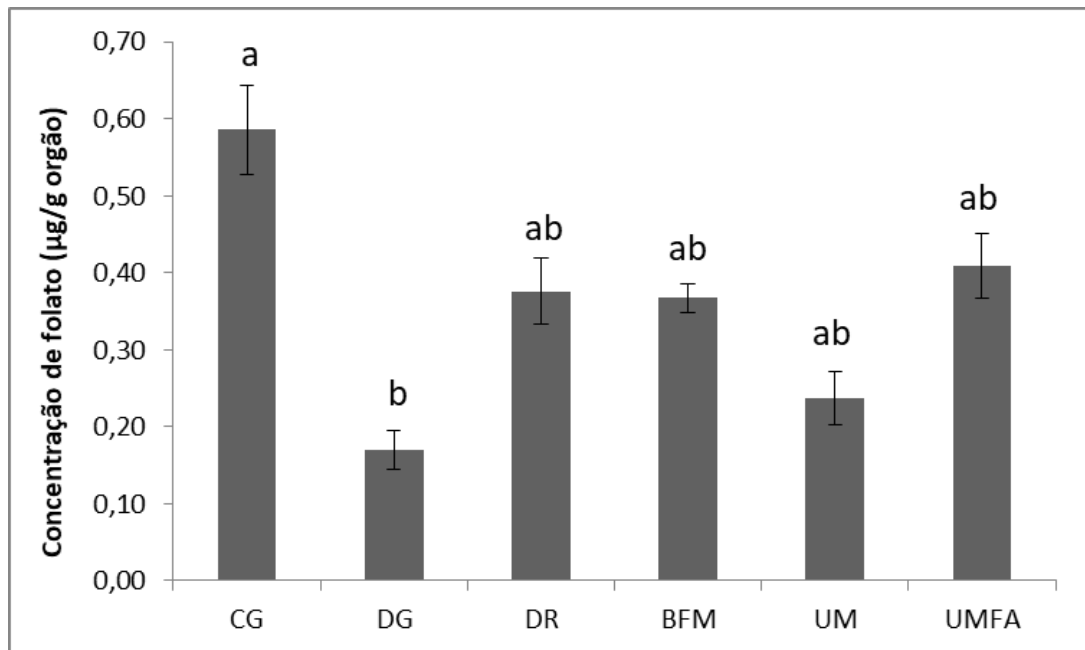
As Figuras 10, 11 e 12 mostram as concentrações de folato detectadas no fígado, baço e rins dos animais dos diferentes grupos estudados, respectivamente.

Figura 10 - Concentração de folato no fígado dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA



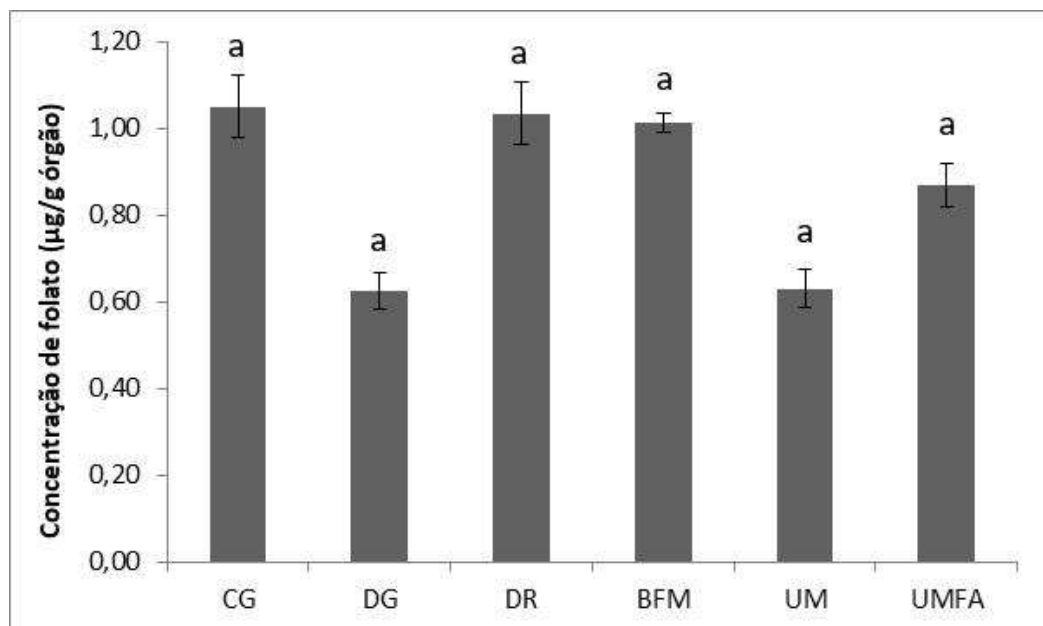
Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

Figura 11 - Concentração de folato no baço dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

Figura 12 - Concentração de folato nos rins dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

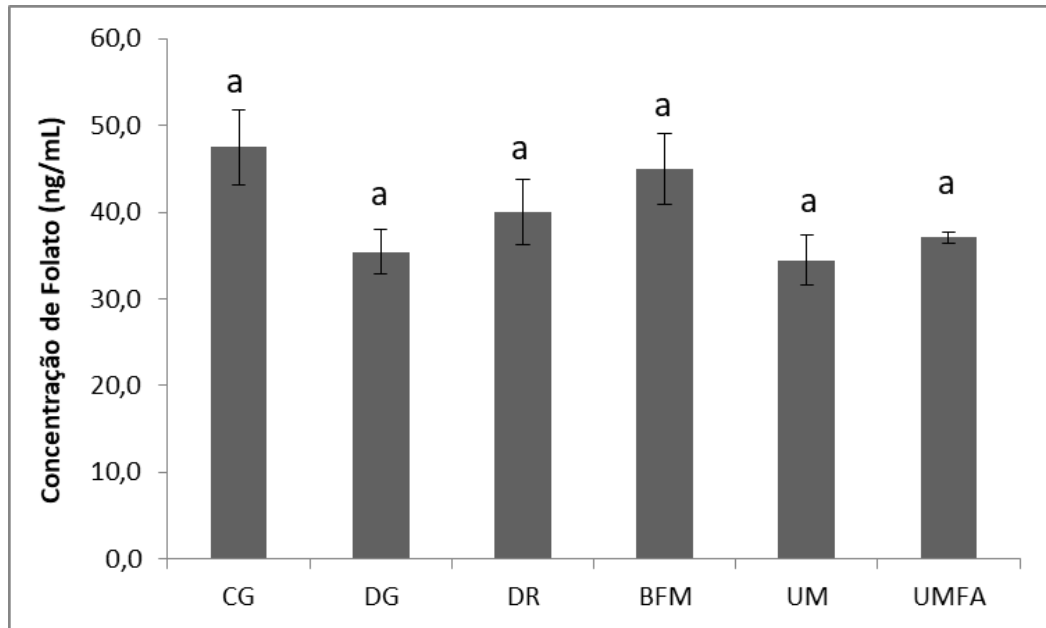
Ao analisar os resultados, é possível observar que os animais do grupo controle apresentaram a maior concentração de folato no fígado (Fig. 10), enquanto os animais grupo depletado foram os que apresentaram as concentrações significativamente mais baixas ($p < 0,05$). Em relação ao baço (Fig 11), o grupo que apresentou maior teor de folato foi o controle (CG), seguido pelos grupos BFM, DR e UMFA. A concentração de folato no baço dos animais do grupo depletado foi estatisticamente menor que dos outros grupos ($p < 0,05$). Já nos rins (Fig.12), a concentração mais baixa foi observada nos camundongos do grupo depletado (DG) e do leite não fermentado (UM), e mais alta nos grupos controle (CG), leite bioenriquecido (BFM) e leite com ácido fólico (UMFA). No entanto, estas diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

Excetuando-se o fígado, em que o grupo UMFA apresentou concentração de folato significativamente maior que o grupo BFM ($p < 0,05$) e igual ao grupo controle ($p > 0,05$), as concentrações de folato nos demais órgãos seguiram uma tendência, em que os órgãos dos animais do grupo depletado apresentaram valores mais baixos que todos outros grupos, enquanto os animais do grupo que recebeu o leite bioenriquecido com folato (BFM) apresentaram teores de folato superiores ou iguais ao animais do grupo depletado-repletado (DR), sem atingir os níveis encontrados no grupo controle (CG).

5.1.2. Concentração de folato no plasma e glóbulos vermelhos

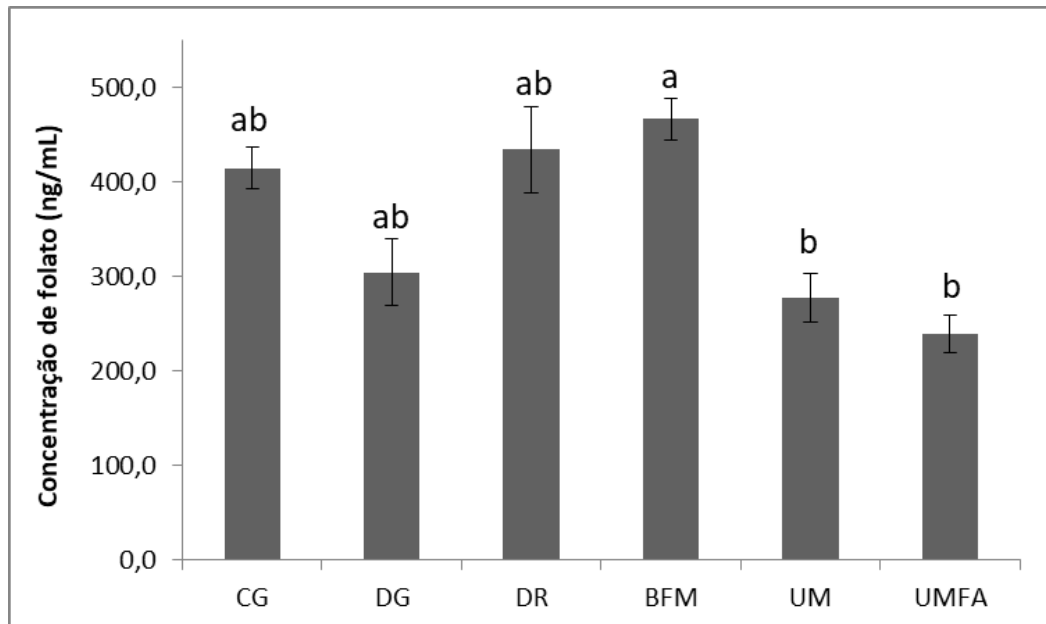
As Figuras 13 e 14 indicam as concentrações de folato no plasma e glóbulos vermelhos dos animais estudados, respectivamente.

Figura 13 - Concentração de folato no plasma dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA.



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

Figura 14 - Concentração de folato nos glóbulos vermelhos dos animais submetidos às dietas CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

Não houve diferença significativa entre os teores de folato detectados no plasma dos animais dos diferentes grupos ($p > 0,05$), contrastando com os observados por Laiño et al (2015), que verificaram que a concentração de folato plasmático é um indicador sensível para avaliar a ingestão da vitamina. Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, observou-se que a concentração média de folato plasmático no grupo depletado DG ($35,4 \pm 2,6$ ng/mL) foi mais baixa que nos grupos controle CG ($47,5 \pm 4,3$ ng/mL), depletado-repletado DR ($40,0 \pm 3,8$ ng/mL) e leite fermentado bioenriquecido BFM ($44,9 \pm 4,1$ ng/mL) e praticamente igual ao grupo leite não fermentado UM ($34,5 \pm 2,8$ ng/mL). O efeito positivo da ingestão do leite bioenriquecido no teor de folato plasmático ficou evidente no grupo BFM, que dentre os grupos experimentais, foi o que resultou na concentração plasmática mais elevada ($44,9 \pm 4,1$ ng/mL) aproximando-se do grupo controle CG ($47,5 \pm 4,3$ ng/mL). Em relação aos glóbulos vermelhos, a concentração de folato mais elevada foi encontrada nos animais do grupo BFM, que foi significativamente maior que em todos os outros grupos, incluindo o grupo controle ($p < 0,05$).

Todos os resultados apresentados indicam que a forma natural da vitamina produzida no leite pela combinação de cepas utilizada, quando administrada com uma dieta isenta de folato, foi efetiva em manter os níveis de folato adequados no organismo, prevenindo a deficiência desta vitamina, observada no grupo depletado (DG). Conclui-se que a forma natural da vitamina presente no leite fermentado com as cepas de BAL estudadas foi absorvida de maneira eficaz pelos camundongos.

A deficiência clínica de folato manifesta-se por uma anemia megaloblástica causada por uma falha na síntese de DNA, que leva a uma menor produção de hemoglobina e alteração da maturação celular durante a eritropoiese. Há também uma diminuição da concentração de folato no plasma e glóbulos vermelhos (MATTSON E SHEA, 2003). Neste trabalho, foi possível observar que os animais do grupo depletado apresentaram diminuição da concentração de folato no baço, fígado e rins, e também no plasma e glóbulos vermelhos, quando comparados aos animais do grupo controle. O hemograma indicou diminuição da hemoglobina e hematócrito, evidenciando a deficiência da vitamina nestes animais. Os animais do grupo que recebeu o leite fermentado bioenriquecido (BFM) apresentaram teor de folato mais elevado nos órgãos analisados, plasma, glóbulos vermelhos e hemograma quando comparados ao grupo depletado (DG) e leite não fermentado (UM). Nos órgão

analisados, exceto fígado, as concentrações de folato foram iguais ao grupo depletado-repletado (DR) e leite com ácido fólico (UMFA) e menores que o grupo controle (CG). Uma possível explicação para o resultado encontrado no fígado é o fato do ácido fólico necessitar ser convertido para sua forma ativa para desempenhar suas funções no organismo. A enzima envolvida nessa conversão, presente no fígado, se satura quando há ácido fólico em excesso. Sendo assim, o ácido fólico pode se concentrar neste órgão ou continuar na circulação sistêmica como ácido fólico não metabolizado (AFNM).

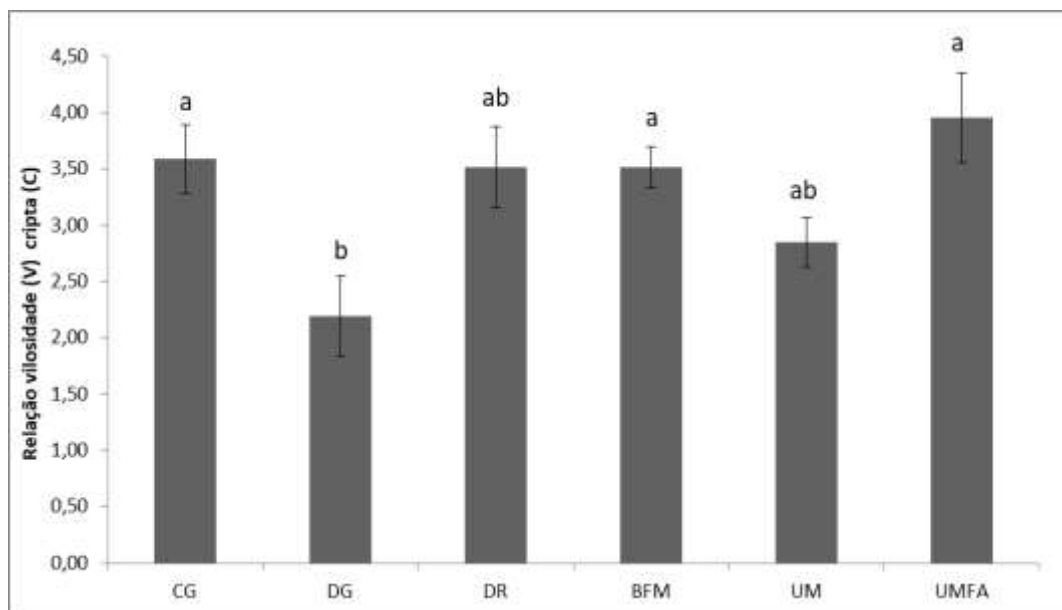
5.1.3. Histologia do intestino

Os resultados da histologia do intestino indicaram danos à mucosa intestinal nos animais do grupo depletado (DG), ocasionados pela falta de vitamina (Fig. 15 e 16), que pode ser observada pela alteração na relação entre o comprimento das vilosidades e profundidade das criptas (μm). A relação vilosidade/cripta (V/C) é muito utilizada para identificar atrofia intestinal, que pode ser causada por doenças como a celíaca. Uma relação $V/C < 2$ indica atrofia vilositária parcial, na qual o comprimento da vilosidade intestinal diminui e o da cripta aumenta. Em casos graves, a mucosa intestinal fica plana, reduzindo drasticamente a absorção de nutrientes (World Gastroenterology Organization, 2011).

A Figura 15 indica a relação entre comprimento da vilosidade e profundidade da cripta das células intestinais dos grupos em estudo. É possível observar diferença significativa na relação vilosidade/cripta apresentada pelos animais dos vários grupos experimentais. No grupo depletado (DG), esta relação foi 2,1, bem abaixo do encontrado nos grupos controle (CG), leite fermentado bioenriquecido (BFM) e leite suplementado com ácido fólico (UMFA), que apresentaram resultados estatisticamente iguais (relação $>3,5$). As fotomicrografias apresentadas na Figura 16 mostram o efeito do folato na mucosa intestinal dos camundongos dos vários grupos experimentais. Os resultados são semelhantes aos reportados por Pan et. al (2017), cuja metanálise permitiu associar deficiência de folato com doenças inflamatórias intestinais.

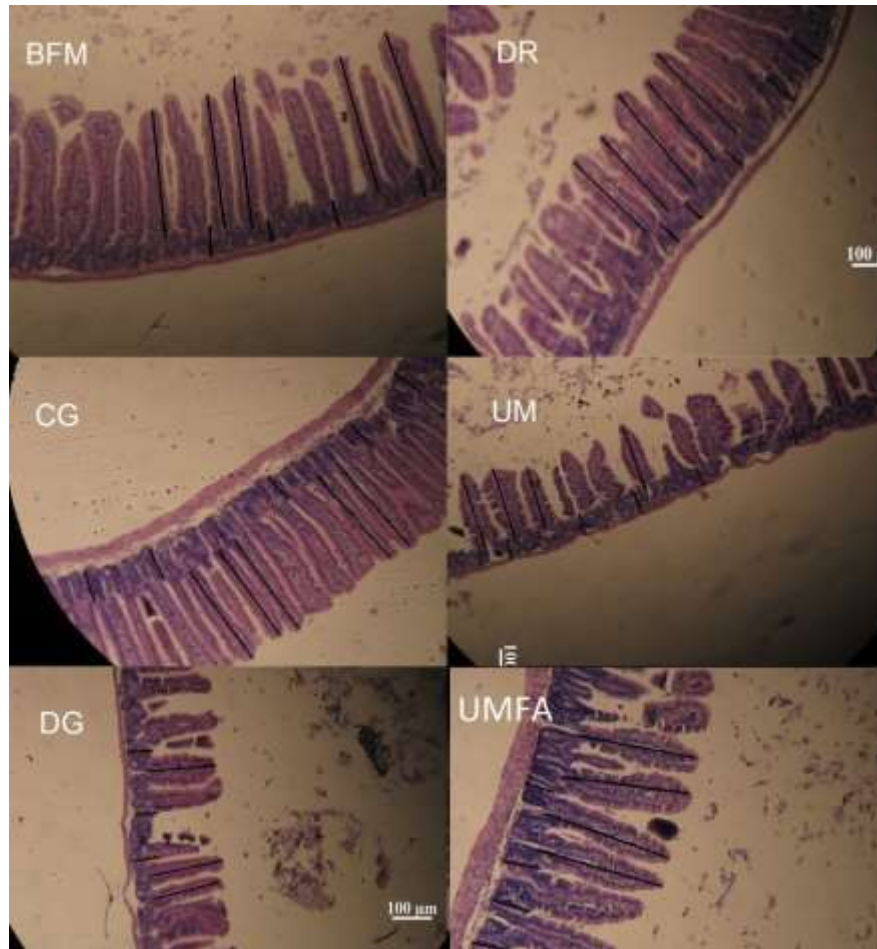
Os resultados deste estudo mostraram que a falta de folato pode ocasionar danos às células intestinais e que a ingestão da forma natural produzida por microrganismos tem efeito benéfico na mucosa, auxiliando na manutenção da saúde intestinal. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da administração de um leite bioenriquecido com a forma natural da vitamina B9 produzida por cepas de BAL nas células intestinais. O potencial anti-inflamatório da suplementação da alimentação com ácido fólico foi visto por Burr et. al, (2017), que observaram a redução do risco de desenvolvimento de câncer colorretal em pacientes que sofrem de doenças inflamatórias intestinais. Também Levit et al (2018) mostraram o efeito benéfico da administração de uma suspensão de cepa produtora de folato em ratos com mucosite. Entretanto, ainda nenhum estudo havia mostrado o efeito da ingestão de um leite bioenriquecido com a forma natural da vitamina B9 nas células intestinais de animais em um modelo de depleção-repleção.

Figura 15 - Relação entre comprimento da vilosidade e profundidade da cripta das células intestinais dos grupos em estudo CG, DG, DR, BFM, UM e UMFA



Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

Figura 16 - Fotomicrografias representativas das células intestinais de cada grupo em estudo (ampliação 100x).



CG: grupo controle; DG: grupo depletado; DR: grupo depletado-repletado; BFM: leite fermentado bioenriquecido; UM:leite não fermentado; UMFA leite não fermentado + ácido fólico.

5.2. Avaliação da segurança das cepas estudadas

No teste spot-on-the-lawn, nenhuma das cepas estudadas apresentou atividade antimicrobiana contra as quatro cepas indicadoras de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados do teste de resistência a antibióticos das cepas estudadas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil de resistência a antibióticos das cepas estudadas (resultados em mm de diâmetro do halo de inibição)

Antibiótico (µg)	<i>Streptococcus thermophilus</i>				<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	34v	170v	268v	341 pc	361v	16cv
Amipicilina + sulbactam (30)	25 (S)	25 (S)	25 (S)	27 (S)	29 (S)	34 (S)
Cefuroxima (30)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	25 (S)
Ceftiofur (30)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	25 (S)
Cefotaxima (30)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	24 (S)	25 (S)
Ciprofloxacina (5)	25 (S)	24 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)	30 (S)
Cotrimoxazol (25)	25 (S)	25 (S)	26 (S)	24 (S)	25 (S)	30 (S)
Enrofloxacina (5)	15 (S)	16 (S)	17 (S)	16 (S)	19 (S)	10 (R)
Gentamicina (10)	10 (R)	9 (R)	10 (R)	10 (R)	8 (R)	20 (S)
Levofloxacina (5)	25 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)	25 (S)	8 (R)
Ofloxacina (5)	25 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	15 (S)
Tetraciclina (30)	25 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)	15 (S)

* S = sensível ; R = resistente

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que as cepas testadas são sensíveis a maioria dos antibióticos testados. As cepas de *St. thermophilus* apresentaram resistência à gentamicina, enquanto a cepa de *Lb. plantarum* foi resistente a levofloxacina e enrofloxacina. Segundo Mathur & Singh (2005), a resistência à gentamicina apresentada pelas cepas de *St. thermophilus* é bastante comum, tendo sido relatada em outros estudos também (Aslim & Beyatli, 2004). Por possuírem o status GRAS (Generally Recognized as Safe),, poucos estudos avaliaram a resistência a antibióticos nestas espécies, embora sejam de fundamental importância para auxiliar no combate a disseminação de resistência à antibióticos através da cadeia alimentar, que é considerada um grave problema de

saúde pública (Zhou et al, 2012).

Nenhuma das cepas estudadas foi positiva para os genes de virulência pesquisados por PCR. Este teste foi importante pois, apesar das cepas estudadas serem de espécies GRAS, poderia ter havido alguma transferência horizontal de genes de virulência, advindos de bactérias patogênicas presentes no meio em que as cepas foram isoladas.

6. CONCLUSÕES

Todas as cepas utilizadas no estudo são boas produtoras de folato, tanto em meio de cultura apropriado para essa produção quanto em leite de vaca, sendo que a quantidade produzida é cepa-dependente. As cepas podem ser consideradas seguras para o uso em alimentos pois não apresentaram positividade para nenhum dos genes de virulência pesquisados e foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados.

A combinação das cepas em co-cultura pode favorecer a produção de folato, dependendo da combinação utilizada. A combinação entre a cepa *Streptococcus thermophilus* 34v e *Lactobacillus plantarum* 16cv resultou em quantidade de folato superior à produzida por cada cepa isoladamente. O pH foi um fator fundamental para a síntese da vitamina pelos microrganismos estudados, sendo que em pH controlado 6, a produção da vitamina foi superior à obtida em pH não controlado. A temperatura desempenhou um papel menos significante que o pH, porém também influenciou positivamente a produção. O estudo mostrou que é possível aumentar a quantidade de vitamina produzida empregando-se condições adequadas de pH e temperatura e combinação correta de cepas.

O folato produzido pelas cepas estudadas mostrou-se biodisponível no modelo animal utilizado, ou seja, a administração de leite fermentado bioenriquecido com cepas produtoras da vitamina foi capaz de não só manter os níveis de folato no organismo adequados, mas também, em alguns casos, ser melhor que no grupo controle e naquele suplementado com ácido fólico. A bioeficácia do folato produzido foi demonstrada pelo aumento dos glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito nestes animais, o que não foi visto nos animais de nenhum outro grupo, incluindo aqueles que receberam ácido fólico.

Apesar de haver vários estudos sobre produção *in situ* de folato por BAL, poucos são os que avaliaram a biodisponibilidade *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em humanos. Até onde se sabe, este foi o primeiro estudo a investigar o efeito da administração de um leite fermentado bioenriquecido com a forma natural da vitamina B9 produzida por cepas de BAL na mucosa intestinal de camundongos, a partir do modelo experimental depleção-repleção. Observou-se que o folato produzido desta maneira apresentou efeito benéfico nas células intestinais, de modo

a manter o intestino saudável em relação a mucosa intestinal (vilosidades e criptas), local que ocorre grande parte da absorção de nutrientes.

O presente trabalho evidenciou que a produção da forma natural da vitamina B9 por bactérias lácticas pode ser uma alternativa eficaz para promover o aumento da ingestão desta vitamina pela população, sem provocar os efeitos adversos causados pela ingestão excessiva da forma sintética da vitamina, o ácido fólico, tendo em vista a bioeficácia encontrada pela ingestão de um produto lácteo bioenriquecido com folato no organismo animal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. A. C. de; BEDANI, R.; MARTA, S.; SAAD, I.; GUY, J.;LEBLANC, J. Increasing Folate Content Through the Use of Lactic Acid Bacteria in Novel Fermented Foods. In: PENNA, A.L.B; NERO, L.A.;TODOROV, S.D. **Fermented foods of Latin America: from traditional knowlege to innovative applications**. Taylor & Francis Group, New Jersey, USA, 2016, cap.13
- ALBUQUERQUE, M. A. C. de; BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26–32, 2016b.
- ALBUQUERQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 261, p. 35–41, 2017.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ENRIQUECIMENTO DE FARINHAS DE TRIGO E DE MILHO COM FERRO E ÁCIDO FÓLICO GERÊNCIA-GERAL DE ALIMENTOS** .Gerência de Pós-Registro de Alimentos, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Enriquecimento+de+farinhas+de+trigo+e+de+milho/b58edc35-4cb3-4b6f-8701-11ec25d00f1f?version=1.4>
- BAYES, J.; AGRAWAL, N.; SCHLOSS, J. The Bioavailability of Various Oral Forms of Folate Supplementation in Healthy Populations and Animal Models: A Systematic Review. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.25, n.2, p. 168-180, 2019.
- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; MODELL, B.; LAWN, J. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n.1, p.110-121, 2010.
- BLOMQVIST, T.; STEINMOEN, H.; HÅVARSTEIN, L. S. Natural genetic transformation: A novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6751–6756, 2006.
- BURR,NICK E.; HULL, MARK A.; SUBRAMANIAN, VENKATARAMAN. Folic Acid Supplementation May Reduce Colorectal Cancer Risk in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.51, n.3, p.247-253, 2017.

- CAPOZZI, V.;RUSSO, P.; DUEÑAS,M.; LÓPEZ,P.;SPANO, G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, n.6, p.1383-1394, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement**, clsi document M100-S25. CLSI, WAYNE, PENNSYLVANIA, USA, 2015. Disponível em: <<http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI2015.pdf>>
- CRIDER, K. S.; BAILEY, L. B.; BERRY, R. J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. **Nutrients**, v. 3, n. 3, p. 370–384, 2011.
- CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAYNE, M. J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 217–222, 2003.
- DANTAS, J.A., DINIZ, A.S., ARRUDA, I.C.G. Consumo alimentar e concentração intra-eritrocitárias de folato em mulheres do Recife, Nordeste do Brasil. **Archivos Latino Americano de Nutricion** v. 60, n.3, p. 227–234, 2010.
- DELCHIER, N.; RINGLING, C.; LE GRANDOIS, J.; AOUDE-WERNER, D.; GALLAND, R.; GEORGÉ, S.; RYCHLIK, M.; RENARD, C. M. G. C. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. **Food Chemistry**, v. 139, n.1–4, p.815–824, 2013.
- DIVYA, J. B. ; NAMPOOTHIRI, K. M. adhavan. Encapsulated Lactococcus lactis with enhanced gastrointestinal survival for the development of folate enriched functional foods. **Bioresource technology**, v. 188, p. 226–230, 2015.
- EITENMILLER, R. R.; LANDEN, W. O. Folate. In: **Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences**. p. 411–466, 1999.
- EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTORITHY. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate. **EFSA Journal**, v. 12, n. 11, p. 3893, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2014.3893>>.
- FEIZOLLAHZADEH, S.; GHIASVAND, R.; REZAEI, A.; KHANAHMAD, H.;SADEGHI, A.; HARIRI, M. Effect of Probiotic Soy Milk on Serum Levels of Adiponectin, Inflammatory Mediators, Lipid Profile, and Fasting Blood Glucose Among Patients with Type II Diabetes Mellitus. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 1, p. 41–47, 2017.
- FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of Pediococcus from cucumber brines. **Applied microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040–1042, 1975.

- GILBODY, S.; LEWIS, S.; LIGHTFOOT, T. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, v.165, p.1–13, 2007.
- GREPPI, A.; HEMERY, Y.; BERRAZAGA, I.; ALMAKSOUR, Z.; HUMBLLOT, C. Ability of lactobacilli isolated from traditional cereal-based fermented food to produce folate in culture media under different growth conditions. **Food Science and Technology**, v.86, n. 277-284, 2017.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.11, n. 8, p. 506–514, 2014.
- HOLASOVÁ, M.; FIEDLEROVÁ, V.; ROUBAL, P.; PECHAČOVÁ, M. Possibility of increasing natural folate content in fermented milk products by fermentation and fruit component addition. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 23, n. 5, p. 196–201, 2005.
- HORNE, D. W. and; PATTERSON, D. Lactobacillus casei Microbiological Assay of Folic Acid Derivatives in 96-Well Microtiter Plates. v. 34, n. 11, p. 2357–2359, 1988.
- HUGENSCHMIDT, S.; SCHWENNINGER, M.; GNEHM, NICOLE; LACROIX, C. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. **International Dairy Journal**, v.20, n.12, p. 852-857, 2010.
- IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, T.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 147–158, 1998.
- IYER, R.; TOMAR, S. K.; KAPILA, S.; MANI, J.; SINGH, R. Probiotic properties of folate producing Streptococcus thermophilus strains. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 103–110, 2010.
- IYER, R.; TOMAR, S. K.; SINGH, R.; SHARMA, R. Estimation of folate in milk by microbiological assay using trienzyme extraction method. **Milchwissenschaft**, v. 64, n. June, p. 125–127, 2009.
- KALMBACH, R. D.; CHOUMENKOVITCH, S. F.; TROEN, A. M.; D'AGOSTINO, R.; JACQUES, P. F.; SELHUB, J. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 3, p. 763–768, 2008.

- KODI, C.; GOTHANDAM, K. M.; PRABAKARAN, G. Identification and Characterization of Folic Acid Producing Potential Starter for Curd Fermentation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 6, p. 118–130, 2015.
- LAHTINEN, S., OUWEHAND, A.C., SALMINEN S., WRIGHT, A.V. **Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects**. CRC press, Florida, USA, 2012.
- LAIÑO, L.; LEVIT, R.; LEBLANC, A.; DE GIORI, G.; LEBLANC, J. Characterization of folate production and probiotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415. **Food Microbiology**, v.79, p.20-26, 2019.
- LAIÑO, J. E.; JUÁREZ DEL VALLE, M.; HÉBERT, E. M.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. Folate production and fol genes expression by the dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* CRL803 in free and controlled pH batch fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 146–150, 2017.
- LAIÑO, J. E.; JUAREZ DEL VALLE, M.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. J. Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 1–5, 2013.
- LAIÑO, J. E.; LEBLANC, Jean Guy; SAVOY DE GIORI, G. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 581–588, 2012.
- LAIÑO, J. E.; ZELAYA, H.; JUÁREZ DEL VALLE, M.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. September, p. 22–32, 2015.
- LAIÑO, J.; VALLE, M. J. del; GIORI, G. S. de; LEBLANC LAIÑO, J. E.; LEBLANC, Jean Guy; SAVOY DE GIORI, G. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 581–588, 2012.
- LAIÑO, J. E.; ZELAYA, H.; JUÁREZ DEL VALLE, M.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. 2 p. 22–32, 2015.
- LAIÑO, J.; VALLE, M. J. del; GIORI, G. S. de; LEBLANC, J. G. Effect of Heat

- Treatment in A Fermented Milk Product Naturally Bio-Enriched in Folate Using Lactic Acid Bacteria. **Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene**, v. 1, p. 427–428, 2014.
- LEBLANC, J. G.; CHAIN, F.; MARTÍN, R.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; COURAU, S.; LANGELLA, P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1 , p.1-10, 2017.
- LEBLANC, J.G.; SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; SESMA, F.; DE VOS, W.; DE GIORI, G.; HUGENHOLTZ, J. Supplementation with engineered *Lactococcus lactis* improves the folate status in deficient rats. **Nutrition**, v. 26, n.7, p.835-841, 2010.
- LEBLANC, J.G.; GIORI, G.S.G, SMID, E.J.HUGENHOLTZ, J.. Folate Production by Lactic Acid Bacteria and other food-grade microorganisms. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, n.2, p. 329–339, 2007.
- LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; DE VALDEZ, G. F.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1297–1309, 2011.
- LEBLANC, J. G.; MILANI, C.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.
- LEVIT, R. DE GIORI, G.; LEBLANC, A.; LEBLANC JG. Folate-producing lactic acid bacteria reduce inflammation in mice with induced intestinal mucositis. *Journal of Applied Microbiology*, v.125, n.5, p. 1494-1501, 2018
- LIN, M. .; YOUNG, C. . Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5–6, p. 409–413, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095869460000056X>>.
- MARZE, S. Bioavailability of Nutrients and Micronutrients: Advances in Modeling and In Vitro Approaches. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 35–55, 2017.
- MATTSON, MARK P.; SHEA, TOMAS B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neuroscience**, v. 26, n.3, p. 137-146, 2003.

- MCKILLOP, D. J.; MCNULTY, H.; SCOTT, J. M.; MCPARTLIN, J. M.; STRAIN, J. J.; BRADBURY, I.; GIRVAN, J.; HOEY, L.; MCCREEDY, R.; ALEXANDER, J.; PATTERSON, B. K.; HANNON-FLETCHER, M.; PENTIEVA, K. The rate of intestinal absorption of natural food folates is not related to the extent of folate conjugation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 167–173, 2006.
- MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.4, p.529–536, 2004.
- MEUCCI, A.; ROSSETTI, L.; ZAGO, M.; MONTI, L.; GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TIDONA, F. Foliates biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* during growth in milk. **Food Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 116–122, fev. 2018.
- MOAZZEN, S.; DOLATKHAH, R.; SADEGH, J.; SHAARBA, J.; ALIZADEH, B. Z.; BOCK, G. H. De; DASTGIRI, S. Folic acid intake and folate status and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v.37, n.6, p. 1926–1934, 2018.
- MOLL, R.; DAVIS, B. Iron, vitamin B 12 and folate. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 198–203, 2017.
- MORAES, G.M.D; ABREU, L.R.; EGITO, A.S.; SALLES, H.O.; SILVA, L.M.F; NERO, L.A.; TODOROV, S.D.; SANTOS, K.M.O. Functional Properties of *Lactobacillus mucosae* Strains Isolated from Brazilian Goat Milk. **Functional Properties of Lactobacillus mucosae Strains Isolated from brazilian goat milk. Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.9,n.3,p.1867-1306.
- MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.
- MOZZI, F., RAYA, R.R., VIGNOLO, G.M. **Biotechnology of lactic acid bacteria : Novel applications**. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2010.
- MUSKIET, F. A., AND KEMPERMAN, R. F. Folate and long-chain polyunsaturated fatty acids in psychiatric disease. **Journal Nutr. Biochem.**, v.17, p. 717-27, 2006.
- NAGHILI, H.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; RAZAVI ROUHANI, S. M.; EHSANI, A.; ZARE, P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary research forum: an international quarterly journal**, v. 4, n. 3, p. 179–83, 2013.

- OHRVIK, V. E.; WITTHOFT, C. M. Human folate bioavailability. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 475–490, 2011.
- ORSOMANDO, G.; BOZZO, G. G.; DE LA GARZA, R. D.; BASSET, G. J.; QUINLIVAN, E. P.; NAPONELLI, V.; RÉBEILLÉ, F.; RAVANEL, S.; GREGORY, J. F.; HANSON, A. D. Evidence for folate-salvage reactions in plants. **Plant Journal**, v. 46, n. 3, p. 426–435, 2006.
- PACHECO DA SILVA, F. F.; BISCOLA, V.; LEBLANC, J. G.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 155–161, 2016.
- PAN, Y.; LIU, Y.; GUO, H.; JABIR, M.; LIU, X.; CUI, W.; LI, D. Associations between Folate and Vitamin B12 Levels and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 382, n.9, p.1-15, 2017.
- PAUL, L.; SELHUB, J. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 53, p. 43–47, 2017.
- POUNIS, G., A.F. CASTELNUOVO, M. LORGERIL, V. KROGH, A. SIANI, J. ARNOUT, F.P. CAPPUCCIO, M. VAN DONGEN, B. ZAPPACOSTA, M.B. DONATI, G. GAETANO, AND L. IACOVIELLO. Folate intake and folate serum levels in men and women from two European populations: the IMMIDIET project. **Nutrition**, v.30,p. 822-830, 2014.
- PURWANDHANI,S.; UTAMI, T.; MILLATI, R.; RAHAYU, E. Potency of Lactobacillus plantarum isolated from Dadih to increase the folate levels in fermented milk. **Agritechnology**,v.37, n.4, p.395-401, 2017.
- REES, J. R.; MORRIS, C. B.; PEACOCK, J. L.; UELAND, P. M.; BARRY, E. L.; MCKEOWN-EYSSEN, G. E.; FIGUEIREDO, J. C.; SNOVER, D. C.; BARON, J. A. Unmetabolized folic acid, tetrahydrofolate, and colorectal adenoma risk. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 8, p. 451–458, 2017.
- ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMONDI, S. Folate production by probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 3, n. 1, p. 118–134, 2011.
- SAINI, R. K.; NILE, S. H.; KEUM, Y. Foliates : Chemistry , analysis , occurrence , biofortification and bioavailability. **FRIN**, v. 89, p. 1–13, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.013>>.
- SALVUCCI, E.; LEBLANC, J. G.; PÉREZ, G. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 185–191, 2016.
- SAUBADE, F.; HEMERY, Y. M.; GUYOT, J.-P.; HUMBLLOT, C. Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3894-3910, 2016.

- SCAGLIONE, F.; PANZAVOLTA, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. **Xenobiotica**, v. 44, n. 5, p. 480–488, 2014.
- SMITH, A. D.; KIM, Y.-I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? RID A-4073-2010. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 3, p. 517–533, 2008.
- SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; TIJSSELING, L.; HOEFNAGEL, M. H. N.; HUGENHOLTZ, J. Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. **Metabolic engineering**, v. 69, n. 8, p. 4542–4548, 2003.
- TEUSINK, B.; MOLENAAR, D. ScienceDirect Systems Biology Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 7–13, 2017.
- WEGKAMP, A.; VAN OORSCHOT, W.; DE VOS, W. M.; SMID, E. J. Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2673–2681, 2007.
- WEGKAMP A, MARS AE, FAIJES M, MOLENAAR D, DE VOS RC, KLAUS SM, HANSON AD, DE VOS WM, S. E. Physiological responses to folate overproduction in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Microbial Cell Factory**, v. 9, p. Microb. Cell Fact., 2010.
- WINKELS, R. M.; BROUWER, I. A.; SIEBELINK, E.; KATAN, M. B.; VERHOEF, P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 465–473, 2007.
- WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION Smecuol, Edgardo; Bai, Julio C. Diagnosis of Celiac Disease. **World Gastroenterology News**, v.16, n.2, 2011. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/publications/e-wgn/e-wgn-expert-point-of-view-articles-collection/diagnosis-of-celiac-disease>