

MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS DE LACTOBACILOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO EM MEIO CONTENDO EXTRATO FENÓLICO OBTIDO DO RESÍDUO DE INDÚSTRIA VITIVINÍCOLA¹

Girlênia dos Santos Silva², Blenda Brito de Queiroz³, Daniely Rayane Bezerra de Farias⁴, Carla Cristina Barboza da Silva⁵, Joyceana Oliveira Correia⁶, Layse Ferreira de Brito⁷, Regina Isabel Nogueira⁸, Flávia Carolina Alonso Buriti⁹, Karina Maria Olbrich dos Santos¹⁰

RESUMO

Objetivou-se avaliar o comportamento de quatro cepas comerciais de *Lactobacillus* com potencial probiótico (*L. casei* BGP93, *L. paracasei* BGP1, *L. paracasei* LPC37 e *L. rhamnosus* LR32) em meio de cultura (caldo de Man Rogosa Sharpe – MRS) enriquecido com diferentes concentrações de extrato fenólico produzido a partir do resíduo de indústria vitivinícola (0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1 mg/ml). A multiplicação das diferentes cepas avaliadas nos meios de cultura contendo o extrato fenólico variou de 8,09 a 10,31 log UFC/ml. Não foram verificadas diferenças em relação à multiplicação de cada microrganismo entre as concentrações de extrato testadas ($p > 0,05$). No entanto, na concentração máxima de extrato utilizada (1 mg/ml) foi observado um aumento da população de *L. rhamnosus*, a qual foi significativamente maior quando comparada às cepas *L. casei* BGP93 e *L. paracasei* BGP1 ($p < 0,05$). Tendo em vista o uso de um microrganismo probiótico em um alimento fermentado contendo o extrato fenólico do resíduo do processamento de uva, considera-se que a presença deste extrato pode estimular a cepa *L. rhamnosus* LR32 na etapa de fermentação, bem como favorecer a viabilidade desse microrganismo ao longo do período de armazenamento do produto, contribuindo para o aumento de seu potencial funcional.

Unitermos: Agregação de valor a coprodutos, Compostos bioativos, Estímulo da multiplicação, Probióticos.

¹ Artigo originalmente apresentado na forma de pôster na IX Jornada Farmacêutica da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016. Trabalho financiado com recursos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

² Graduanda em Química Industrial, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. girlenia.silva@gmail.com

³ Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. blendabq@hotmail.com

⁴ Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. danyhtg@hotmail.com

⁵ Graduanda em Farmácia, Centro Universitário da Zona Oeste, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. carlacristina201025@hotmail.com

⁶ Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. joyceana@live.com

⁷ Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. layse_brasil@hotmail.com

⁸ Embrapa Agroindústria de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. regina.nogueira@embrapa.br

⁹ Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. flavia@ccbs.uepb.edu.br

¹⁰ Embrapa Agroindústria de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. karina.dos-santos@embrapa.br

Growth of potentially probiotic lactobacilli cultures in medium added with phenolic extract from grape pomace, a winemaking industry by-product

ABSTRACT

The behavior of four commercial strains of potentially probiotic *Lactobacillus* (*L. casei* BGP93, *L. paracasei* BGP1, *L. paracasei* LPC37 and *L. rhamnosus* LR32) in culture media (de Man Rogosa Sharpe – MRS broth) enriched with different concentrations of phenolic extract (0 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1 mg/ml) obtained from grape pomace, a by-product of winemaking industry. The growth of the different evaluated strains in the culture media added of the phenolic extract ranged from 8.09 to 10.31 log CFU/ml. No significant difference ($p > 0.05$) between the tested concentrations of extract was verified concerning the growth of the evaluated microorganisms. Nonetheless, in the maximum concentration of extract used (1 mg/ml) it was observed an increase in the population of *L. rhamnosus*, which was significantly higher when compared to *L. casei* BGP93 and *L. paracasei* BGP1 ($p < 0,05$). In view of the use of a probiotic microorganism in a fermented food product added of the phenolic extract of grape pomace, it can be considered that the presence of this extract can stimulate the strain *L. rhamnosus* LR32 during the fermentation process, as well as, improve the viability of this microorganism during the product' storage, increasing its functional potential.

Uniterms: By-products upgrading, Bioactive compounds, Growth promotion, Probiotics.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos com características nutricionais adequadas e com componentes capazes de resultar em efeito benéfico em uma ou mais funções alvo do organismo, relevantes para a melhoria da saúde e do bem estar, bem como para a redução do risco de doenças, têm sido referidos como funcionais (ROBERFROID, 2005; HENSON; MASAKURE; CRANFIELD, 2008). Os alimentos funcionais adicionados de culturas probióticas e aqueles contendo compostos fenólicos com atividade antioxidante são alguns exemplos (ANDERSEN; FERNANDEZ, 2013).

Em atualização recente da International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), os probióticos foram definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro (HILL et al., 2014). Dessa forma, a modulação da microbiota intestinal através da ingestão de probióticos tem sido uma importante estratégia voltada à prevenção de patologias e à promoção da saúde, uma vez que o desequilíbrio microbiano do trato digestório está diretamente associado com o desenvolvimento e a severidade de doenças crônicas (ANDERSEN; FERNANDEZ, 2013).

Frutas e hortaliças contêm vários compostos bioativos com atividade antioxidante (ZULUETA et al., 2007), dentre os quais os compostos fenólicos merecem destaque. Essa significativa atenção conferida aos compostos fenólicos é devido, principalmente, ao seu poder antioxidante, correlacionado à redução do risco de doenças crônico-degenerativas

(KARAASLAN et al., 2011; ANDERSEN; FERNANDEZ, 2013). Tais benefícios à saúde são decorrentes da proteção que os antioxidantes conferem contra radicais livres prejudiciais, produzidos pelo metabolismo aeróbico (ZULUETA et al., 2007). No entanto, a maioria das substâncias de interesse de frutas e hortaliças é encontrada em partes que são desprezadas como cascas e bagaços. Desta forma, verifica-se a importância de agregar valor a estes coprodutos através de soluções para melhorar a alimentação humana, além de evitar a poluição ambiental gerada pelo descarte inapropriado desses resíduos (MARQUES, 2013).

O resíduo da indústria vitivinícola, em particular, possui uma elevada concentração de fenólicos devido ao acúmulo destes compostos nas cascas e sementes das uvas, os quais são pouco extraídos durante a fabricação do vinho. Os compostos fenólicos encontrados nestas cascas e sementes são principalmente antocianinas, catequinas, quercetina, camferol, ácidos e álcoois fenólicos, além de estilbenos. Não há agregação de valor aos resíduos gerados pelas indústrias de processamento de uva e, em muitos casos, são descartados em áreas abertas ocasionando problemas ambientais consideráveis. Técnicas de extração dos compostos fenólicos do resíduo das indústrias vitivinícolas são estratégias viáveis de agregação de valor a esse coproduto, podendo resultar na obtenção de novos alimentos com potenciais benefícios à saúde (DOS SANTOS et al., 2016).

Para exercer os benefícios à saúde, os compostos fenólicos precisam ser biodisponíveis e absorvidos para o sistema circulatório. A microbiota intestinal humana contribui para várias funções metabólicas importantes para o hospedeiro, inclusive para a disponibilidade dos polifenóis ingeridos através da alimentação (PEREIRA-CARO et al., 2015). Vários compostos fenólicos não são absorvidos no intestino, necessitando da fermentação pela microbiota intestinal para a quebra de suas estruturas em unidades menores, para então serem absorvidas e metabolizadas. Paralelamente, os compostos fenólicos modulam a composição da microbiota intestinal através da inibição dos microrganismos patogênicos e do estímulo das bactérias benéficas (TULIPANI et al., 2012; LI et al., 2016).

Adicionalmente, tem sido mostrado que algumas cepas de *Lactobacillus* com potencial probiótico podem contribuir para a elevação da capacidade antioxidante de alimentos fermentados contendo ingredientes ricos em compostos fenólicos (MOUSAVI et al., 2013). Ao mesmo tempo, ingredientes ricos em compostos fenólicos podem estimular culturas probióticas durante a fermentação (HERVET-HERNÁNDEZ et al., 2009), além de proteger tais microrganismos ao longo do armazenamento em alimentos lácteos fermentados (DOS SANTOS et al., 2016).

Este estudo avaliou a influência de diferentes concentrações do extrato fenólico obtido do resíduo de indústria vitivinícola sobre a multiplicação de culturas comerciais com potencial probiótico, visando selecionar cepas de lactobacilos para a incorporação em alimentos fermentados funcionais adicionados desse ingrediente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O resíduo utilizado para a produção dos extratos ricos em fenólicos consistiu de bagaço da casca de uva Merlot, oriundo da produção de vinho tinto, gentilmente cedido pela Casa Valduga (Bento Gonçalves, RS, Brasil). O extrato rico em fenólicos foi produzido na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), desidratado, e encaminhado para o Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande, PB, Brasil). O extrato em pó foi armazenado ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, até o uso nos ensaios de multiplicação de lactobacilos. Para este fim, foi utilizada a metodologia descrita por Hervert-Hernández et al. (2009), com adaptações.

As culturas utilizadas nos ensaios consistiam de culturas comerciais liofilizadas, sendo elas: *Lactobacillus casei* BGP93 (Sacco, Cadorago, Itália), *Lactobacillus paracasei* BGP1 (Sacco, Cadorago, Itália), *Lactobacillus paracasei* LPC37 (Danisco, DuPont, Madison, WI, EUA) e *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (Danisco, DuPont, Madison, WI, EUA). Previamente aos ensaios, as culturas liofilizadas, mantidas congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram ativadas a $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante a noite, em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, EUA), preparado conforme as instruções do fabricante. As culturas ativadas foram diluídas em caldo MRS até a obtenção de valores de absorvância a 630 nm entre 0,8 e 2,4. Para uso nos ensaios, as culturas com absorvância entre 0,8 e 1,6 foram novamente diluídas a 0,4% (v/v) utilizando caldo MRS, enquanto que as culturas com absorvância entre 1,6 e 2,4 foram diluídas a 0,1% (v/v), também em caldo MRS.

Para os ensaios foram utilizadas quatro soluções de extrato fenólico dissolvido em água destilada (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 4 mg/mL) para alcançar uma concentração final de extrato no conteúdo total do ensaio de 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1 mg/ml. A solução mãe de extrato (4 mg/mL) foi esterilizada em autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$). As demais soluções foram obtidas por diluição decimal seriada da solução mãe autoclavada utilizando água destilada estéril.

Uma alíquota de 50 μL da cultura diluída (0,4% ou 0,1%) foi adicionada de 1 ml da solução contendo o extrato (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL ou 4 mg/mL) e 3 ml de caldo MRS para incubação a $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Um ensaio controle (0 mg/ml de extrato fenólico), para cada microrganismo, foi preparado utilizando 1ml de água estéril em substituição à solução contendo o extrato.

Diluições decimais seriadas dos cultivos dos microrganismos na presença dos extratos foram preparadas com solução salina (0,85 g/100 ml) a partir de 1 ml de amostra coletada em condições de assepsia. Alíquotas de 1 ml das diluições foram transferidas para placas de Petri estéreis e adicionadas de ágar MRS (Difco, Sparks, MD, EUA) fundido e resfriado. Após o endurecimento do ágar, as placas foram mantidas a $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h para obtenção das populações de microrganismos.

Para a apresentação dos resultados foram calculadas as médias e o desvio padrão para cada microrganismo e concentração de extrato. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey considerando

5% de significância ($p < 0,05$). Antes da realização da ANOVA, os dados foram verificados quanto à normalidade e à homogeneidade das variâncias usando os testes de Shapiro Wilk e Bartlett, respectivamente. Aplicou-se o teste não paramétrico para os casos em que a normalidade e a homogeneidade de variâncias não foram observadas. Para a análise estatística foi utilizado o programa Statistica, versão 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da multiplicação das diferentes cepas de lactobacilos na presença de extrato fenólico do resíduo do processamento de uvas Merlot são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Multiplicação de diferentes cepas de lactobacilos na presença de extrato fenólico de resíduo de indústria vitivinícola.

Tratamento	Concentração final de extrato fenólico no meio MRS (mg/ml)				
	0	0,125	0,250	0,5	1
	<i>Lactobacillus</i> sp. (log UFC/ml)				
BGP93	8,58 ± 0,38 ^{Aa}	8,82 ± 0,58 ^{Aa}	8,69 ± 0,68 ^{Aa}	8,28 ± 0,55 ^{Aa}	8,81 ± 0,48 ^{Aa}
BGP1	8,94 ± 0,66 ^{Aa}	8,31 ± 0,46 ^{Aa}	8,40 ± 0,50 ^{Aa}	8,50 ± 0,76 ^{Aa}	8,09 ± 0,34 ^{Aa}
LPC37	8,90 ± 0,79 ^{Aa}	9,34 ± 0,81 ^{Aa}	9,28 ± 0,72 ^{Aa}	8,80 ± 0,80 ^{Aa}	9,06 ± 0,91 ^{Aba}
LR32	9,27 ± 0,34 ^{Aa}	9,24 ± 0,23 ^{Aa}	9,30 ± 0,42 ^{Aa}	9,26 ± 0,49 ^{Aa}	10,31 ± 0,67 ^{Ba}

BGP93 = *L. casei* BGP93; BGP1 = *L. paracasei* BGP1; LPC-37 = *L. paracasei* LPC-37; LR-32 = *L. rhamnosus* LR32.

^a letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p > 0,05$) para um mesmo tratamento entre as diferentes concentrações de extrato.

^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p > 0,05$) para uma mesma concentração de extrato entre os diferentes microrganismos (tratamentos).

A multiplicação das diferentes cepas avaliadas nos meios de cultura variou de 8,09 a 10,31 log UFC/ml. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), entre as diferentes concentrações de extrato fenólico avaliadas para um mesmo microrganismo. Do mesmo modo, não foram observadas diferenças significativas entre os microrganismos avaliados nos ensaios contendo entre 0 a 0,5 mg/ml de extrato ($p > 0,05$). No entanto, verificou-se que o extrato fenólico na concentração de 1 mg/ml resultou na maior multiplicação do microrganismo *L. rhamnosus* LR32 quando comparado às concentrações de extrato inferiores, apesar de não significativa ($p > 0,05$) e também em relação às outras cepas nesta e nas demais concentrações de extrato. Na comparação entre os microrganismos, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a cepa *L. rhamnosus* LR32 e as cepas *L. casei* BGP93 e *L. paracasei* BGP1 na concentração máxima de extrato utilizada nos ensaios (1 mg/ml).

De modo semelhante ao observado neste estudo para a cepa *L. rhamnosus* LR32, Hervert-Hernández et al. (2009) verificaram que o extrato do resíduo do processamento de uvas na concentração final de 1 mg/ml em meio MRS com dimetilsulfoxido foi capaz de

promover a multiplicação da cepa *Lactobacillus acidophilus* CECT903, incubando em anaerobiose a 37 °C, por 48 h. De acordo com os autores, determinados microrganismos, como os lactobacilos, apresentam a capacidade de metabolizar os compostos fenólicos durante a multiplicação e utilizá-los como fonte de energia celular. Ainda segundo os autores, os compostos fenólicos também poderiam aumentar o consumo de nutrientes, como os açúcares, por esses microrganismos.

Adicionalmente, conforme foi mencionado por dos Santos et al. (2016), durante a fermentação são produzidos pelos microrganismos determinados metabólitos oxigênicos, os quais se tornam tóxicos a medida que se acumulam no meio. Segundo os autores, os compostos fenólicos do resíduo do processamento da uva apresentam reconhecida atividade antioxidante e poderiam captar estes metabólitos oxigênicos tóxicos, protegendo os lactobacilos probióticos contra o ambiente hostil que vai se formando como resultado do processo fermentativo.

De acordo com Li et al. (2016), o uso de ingredientes ricos em compostos fenólicos poderia ser efetivo para aumentar a capacidade antioxidante dos produtos fermentados e auxiliar na viabilidade de lactobacilos probióticos, especialmente aqueles que não possuem um eficiente sistema contra o acúmulo intracelular de metabólitos tóxicos, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, entre outros, os quais são formados durante o processo fermentativo e como resultado da atividade metabólica destes microrganismos, podendo levar à morte da célula durante o armazenamento dos produtos.

4. CONCLUSÃO

A cepa *L. rhamnosus* LR32 apresentou a maior multiplicação na concentração máxima, avaliada neste estudo, de extrato fenólico do resíduo do processamento de uvas Merlot. Considerando o uso simultâneo de um microrganismo probiótico em um alimento fermentado contendo o extrato fenólico do resíduo vitivinícola, a presença deste extrato poderia estimular a cepa *L. rhamnosus* LR32 na etapa de fermentação, bem como favorecer a viabilidade desse microrganismo ao longo do período de armazenamento do produto.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Macroprograma 3 no. 03.14.13.003.00.00), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 137976/2015-1 e 477799/2012-4) e ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Estadual da Paraíba (PIBIC/CNPq/UEPB) pelo auxílio financeiro e bolsas. Os autores também agradecem às empresas Casa Valduga e DuPont pelo fornecimento de parte dos materiais utilizados neste estudo e ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos da Universidade Estadual da Paraíba (NUPEA/UEPB) pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C.J.; FERNANDEZ, M.L. Dietary strategies to reduce metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, p. 241-254, 2013.

DOS SANTOS, K. M.O. ; DE OLIVEIRA, I. C. ; LOPES, M. A. C. ; CRUZ, A. P. G.; BURITI, F. C. A. ; CABRAL, L. M. Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7836>. Acesso em 12 set. 2016.

HENSON, S.; MASAKURE, O.; CRANFIELD, J. The propensity for consumers to offset health risks through the use of functional foods and nutraceuticals: the case of lycopene. **Food Quality and Preference**, v. 19, p. 395-406, 2008.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; PINTADO, C.; ROTGER, R.; GOÑI, I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 119-122, 2009.

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. 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, p. 506-514, 2014.

KARAASLAN, M.; OZDEN, M.; VARDIN, H.; TURKOGLU, H. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1065-1072, 2011.

LI, S.; MA, C.; GONG, G.; LIU, Z.; CHANG, C.; XU, Z. The impact of onion juice on milk fermentation by *Lactobacillus acidophilus*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 543-548, 2016.

MARQUES, T.R. **Aproveitamento tecnológico de resíduos da acerola: farinhas e barras de cereais**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M., RAZAVI, S. H., HADINEJAD, M., EMAM-DJOMEH Z., MIRZAPOUR, M. Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. **Food Biotechnology**, v. 27, p. 1–13, 2013.

PEREIRA-CARO, G.; OLIVER, C.M.; WEERAKKODY, R.; SINGH, T.; CONLON, M.; BORGES, G.; SANGUANSRI, L.; LOCKETT, T.; ROBERTS, S.A.; CROZIER, A.; AUGUSTIN, M.A. Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 206-214, 2015.



ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, 2005. Supplement 1, p. S13-S25.

TULIPANI, S.; URPI-SARDA, M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; RABASSA, M.; LÓPEZ-URIARTE, P.; BULLÓ, M.; JÁUREGUI, O.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; SALAS-SALVADÓ, J.; ESPÍN, J.C.; ANDRÉS-LACUEVA, C. Urolithins are the main urinary microbial-derived phenolic metabolites discriminating a moderate consumption of nuts in free-living subjects with diagnosed metabolic syndrome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8930-8940, 2012.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRASQUET, I.; FRÍGOLA, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1365-1364, 2007.