

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA**  
**E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**PASTEURIZAÇÃO LENTA (LTLT) DO LEITE HUMANO  
ORDENHADO (LHO): EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO DE  
ISOLADOS DE BIFIDOBACTÉRIAS DE ORIGEM HUMANA**

**ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DO JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PASTEURIZAÇÃO LENTA (LTLT) DO LEITE HUMANO  
ORDENHADO (LHO): EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO DE  
ISOLADOS DE BIFIDOBACTÉRIAS DE ORIGEM HUMANA**

**ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Rosa Helena Luchese**

*e Coorientação da Professora*  
**Cheila Gonçalves Mothé**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de Concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ  
2013

637.1  
G934p  
T

Guerra, André Fioravante, 1983-  
Pasteurização lenta (LTLT) do leite humano ordenhado (LHO): efeito sobre o crescimento de isolados de bifidobactérias de origem humana / André Fioravante Guerra. - 2013.  
68 f.: il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

Bibliografia: f. 61-68.

1. Leite - Pasteurização - Teses. 2. Leite humano - Composição - Teses. 3. Leite humano - Análise - Teses. 4. Prebióticos - Teses. 5. Bifidobacterium - Teses. 6. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Luchese, Rosa Helena, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de Concentração em Ciência de Alimentos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10/06/2013

---

Rosa Helena Luchese. Ph.D.UFRRJ  
(Orientador)

---

José Francisco Martins. Ph.D. UFRRJ  
(membro)

---

Carla Reis de Araújo. Dr. UFRJ  
(membro)

## DEDICATÓRIA

*À todas as mães, por conferir vida ao mundo.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo Dom da vida e por sempre guiar e iluminar meus caminhos.

À minha orientadora Prof. PhD **Rosa Helena Luchese**, pela confiança depositada em meus trabalhos, pelo ensinamentos e atenção que sempre teve comigo. Por ser uma pessoa a qual admiro muito como profissional e como amiga.

Aos meus queridos pais **Alberto Guerra** e **Elvira Sueli Castelani Guerra**, que me ensinaram o valor da vida e sempre deram todo apoio para que eu pudesse estar vencendo mais esta etapa em minha vida. Obrigado por estarem sempre do meu lado.

Ao meu irmão **Carlos Alberto Guerra**, pela amizade e por sempre estar dando força em tudo que sempre precisei.

À minha namorada **Edimara Genghini Bueno**, por todo carinho, atenção, dedicação, amizade que sempre me tem dado. Obrigado por sempre estar do meu lado, por me dar força principalmente nos momentos difíceis da minha vida. Todo meu carinho e admiração pela pessoa que você é.

À minha amiga e Técnica do Laboratório **Ediná Rodrigues**, pela força oferecida como profissional e como amiga desde quando comecei minha vida acadêmica na UFRRJ até hoje.

Aos funcionários do laboratório de microbiologia, **Valéria, Cristiane** e **Ivan**, pela grande ajuda prática prestada a este trabalho.

À minha coorientadora **Cheila Gonçalves Mothé**, primeiramente por ter aceitado a coorientação da dissertação e pelo conhecimento transmitido e agregado a este trabalho.

Às doadoras de leite **Alice**, mãe do **Rafael** e **Janaína**, mãe do **Pedro**, pois não seria possível realizar este trabalho sem o carinho e atenção que sempre tiveram.

Ao prof. Dr. **Franz Reis**, pelo fornecimento das amostras e pela atenção e disposição que tens nos oferecido.

À **Lucimar** e a prof. Dr. **Simone**, por todos os serviços prestados coordenando o curso de pós graduação.

Ao **CNPQ**, pelo patrocínio oferecido.

À todos **funcionários** e **professores** do Departamento de Tecnologia de Alimentos que forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

GUERRA, André Fioravante. **Pasteurização lenta (LTLT) do leite humano ordenhado (LHO): Efeito sobre o crescimento de isolados de bifidobactérias de origem humana.** 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

O leite humano, além de conter fatores de crescimento para o lactente, é uma fonte de inúmeros componentes multifuncionais, como substâncias antioxidantes e antimicrobianas. Porém, em alguns casos, a sua oferta pelas mães não é possível e diante destas circunstâncias, criaram-se bancos de leite humano (BLH). O leite humano ordenhado (LHO) é submetido, nos bancos de leite, ao processo conhecido como pasteurização lenta (62,5°C/30 minutos). Este processo visa à eliminação dos microrganismos patogênicos e a redução dos contaminantes a um nível aceitável, porém pode resultar em perda de atividade de substâncias termo sensíveis. Bifidobactérias são os principais constituintes da microbiota intestinal de lactentes saudáveis e o crescimento e a colonização do intestino por estas bactérias são estimulados pela alimentação com leite materno. O objetivo desta pesquisa foi avaliar, *in vitro*, o efeito do processo de pasteurização lenta do leite humano sobre seu potencial bifidogênico. Em adição isolados de bifidobactérias foram avaliadas em relação a sua atividade probiótica no que diz respeito a resistência a lisozima e capacidade de fermentação de diferentes carboidratos. Dos 27 bacilos Gram positivos e catalase negativos previamente isolados da microbiota intestinal de lactentes, 25 foram positivos para a enzima fosfato-6-fosfocetolase, exclusiva deste gênero. Todas as cepas de *Bifidobacterium* de origem humana foram resistentes a lisozima. O crescimento destes isolados de bifidobactérias em leite humano ordenhado desnatado cru (LDC) e pasteurizado (LDP) e re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) foi avaliado. Houve estimulação do crescimento de todas as culturas de bifidobactérias em LDC quando comparado ao leite pasteurizado, independente de ter sido re-adicionado de gordura. A pasteurização lenta reduziu o potencial bifidogênico do leite humano ordenhado indicando que a redução ocorreu nos componentes bioativos que estão solubilizados no soro, e não na fração gordurosa do leite humano. Para avaliar possíveis mudanças ocorridas nos compostos bioativos, amostras de LDC e LDP assim como amostras re-adicionadas de gordura (LDC-G e LDP-G) foram liofilizadas e submetidas à termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Da mesma forma, amostras de leite humano cru e pasteurizado foram quantificados quanto à atividade de lisozima pelo método lisoplate. As técnicas de análise térmica apontou indícios de redução no conteúdo dos componentes bioativos presentes no leite humano decorrente da pasteurização lenta. Por outro lado, a enzima lisozima mostrou-se estável ao tratamento térmico de pasteurização lenta, cuja atividade não foi afetada.

**Palavras-chave:** leite humano, pasteurização, compostos bioativos.

## ABSTRACT

GUERRA, André Fioravante. **Slow pasteurization of human milk: Effect on the growth of human isolates of bifidobacteria.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology). Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Human milk contains all growth factors for the nursing. Besides, it is a source of numerous multifunctional components, such as antioxidants and antimicrobial substances. However, in some cases, its offer by mothers is not possible and in consequence of these circumstances human milk bank (HMB) were created. The milked human milk is submitted in milk banks, to the process known as slow pasteurization (62.5°C/30 minutos). This process aims the elimination of pathogenic microorganisms and the reduction of spoilages to an acceptable level, but it can result in loss of activity of heat-sensitive substances. Bifidobacteria are the main constituents of the intestinal microbiota of healthy infants and the growth and colonization of the gut by these bacteria are stimulated by feeding with breast milk. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of the pasteurization process of human milk on its bifidogenic potential. In addition, bifidobacteria isolates were evaluated for their probiotic activity regarding to their resistance to lysozyme and the ability to ferment different carbohydrates. Initially, 27 cultures of presumptive Bifidobacteria, isolated from the intestinal microbiota of infants, were confirmed by the presence of the enzyme fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), unique to this genus. Out of 27 Gram positive, catalase negative previously isolated, 25 showed to be positive for the enzyme F6PPK. All bifidobacteria isolated from human origin were resistant to lysozyme. We evaluated the growth of these isolates of bifidobacteria in milked skimmed raw (SRM) and pasteurized (SPM) human milk and re-added of pasteurized fat (SRM-F and SPM-F). Growth of all bifidobacteria cultures were stimulated in SRM, despite the re-addition of fat, as compared to the pasteurized milk. The slow pasteurization reduced the bifidogenic potential of human milk indicating that the reduction occurred in bioactive components that are solubilized in the whey and not in the human milk fat fraction. To assess possible changes in bioactive compounds, samples of SRM and SPM as well as samples re-added of fat (SRM-F and SPM-F) were lyophilized and subjected to thermogravimetry (TG), derivative thermogravimetry (DTG), differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC). Similarly, samples of raw and pasteurized human milk were evaluated in relation to the lysozyme activity by the method of liso-plate. Using the thermal analysis techniques it was found signs of reduction in the content of bioactive components in human milk due to pasteurization. On the other hand, the enzyme lysozyme showed to be stable to pasteurization heat treatment, whose activity was not affected.

**Key Word:** human milk, pasteurization, bioactive compounds.

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b> - Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos por Bifidobactérias isoladas do intestino de lactentes de até 15 dias de vida .....	<b>42</b>
<b>Tabela 2</b> – Quantificação da atividade da lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado (LTLT) .....	<b>55</b>
<b>Tabela 3</b> – Média e desvio padrão dos valores de atividade de lisozima em 32 amostras de leite humano ordenhado cru e pasteurizado .....	<b>58</b>
<b>Quadro 1</b> – Funções gerais das enzimas do leite humano .....	<b>18</b>
<b>Quadro 2</b> – Efeito da pasteurização sobre constituintes bioativos do colostro humano .....	<b>20</b>
<b>Quadro 3</b> – Possíveis efeito prebiótico dos oligossacarídeos do leite humano .....	<b>24</b>
<b>Quadro 4</b> – Perfil de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias de origem humana .....	<b>25</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquematização do experimento de capacidade de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.....	31
<b>Figura 2</b> – Fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.....	32
<b>Figura 3</b> – Preparação das amostras de leite humano ordenhado para pasteurização (A) e pasteurização em banho termostático (B).....	33
<b>Figura 4</b> – Esquematização do experimento de comparação do efeito bifidogênico do leite humano ordenhado cru e pasteurizado (desnatados e desnatados re-adicionados de gordura pasteurizada) .....	30
<b>Figura 5</b> – Esquematização do experimento de resistência de bifidobactérias à lisozima .....	37
<b>Figura 6</b> – Esquematização do experimento da quantificação de lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado.....	39
<b>Figura 7</b> - Resultado positivo e negativo para o teste da presença da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase, exclusiva de bifidobactérias.....	41
<b>Figura 8</b> - Comparação do efeito bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Cru e Pasteurizado (Desnatados e Desnatados re-adicionados de Gordura Pasteurizada) da doadora D1 .....	44
<b>Figura 9</b> - Comparação do efeito bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Cru e Pasteurizado (Desnatados e Desnatados re-adicionados de Gordura Pasteurizada) da doadora D2 .....	44
<b>Figura 10A</b> – Termogravimetria do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D1 .....	48
<b>Figura 10B</b> – Termogravimetria derivada do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D1 .....	48
<b>Figura 10C</b> – Análise Térmica Diferencial do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D1 .....	48

<b>Figura 10D</b> – Calorimetria Exploratória Diferencial do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D1 .....	<b>48</b>
<b>Figura 11A'</b> – Termogravimetria do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D2 .....	<b>49</b>
<b>Figura 11B'</b> – Termogravimetria Derivada do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D2 .....	<b>49</b>
<b>Figura 11C'</b> – Análise Térmica Diferencial do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D2 .....	<b>49</b>
<b>Figura 11D'</b> – Calorimetria Exploratória Diferencial do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado re-adicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D2 .....	<b>48</b>
<b>Figura 12A''</b> – Termogravimetria do padrão lisozima .....	<b>49</b>
<b>Figura 12B''</b> – Termogravimetria derivada do padrão lactoferrina .....	<b>49</b>
<b>Figura 13</b> – Crescimento de bifidobactérias em presença e ausência lisozima .....	<b>53</b>
<b>Figura 14</b> – Confecção dos poços (A,B); enchimento dos poços com LHO (C); halos de inibição de diferentes concentrações de lisozima de ovo branco (D); halos de inibição do LHO cru e pasteurizado (E); medição dos halos de inibição (F) .....	<b>58</b>
<b>Figura 15</b> - Comparação entre os ensaios lisoplate realizados por Gupta et al. (A) e os encontrados com os padrões de lisozima de ovo branco deste experimento (B), ambos frente ao <i>Micrococcus luteus</i> .....	<b>59</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

LTLT	Low temperature long time;
BHL	Banco de leite humano;
LHO	Leite humano ordenhado;
PC	Ponto de coleta;
LC	Leite coletado;
LD	Leite distribuído;
F6KPP	Frutose-6-fosfato fosfocetolase;
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide;
PCR	Polymerase chain reaction;
LDC	Leite desnatado cru;
LDP	Leite desnatado pasteurizado;
LDC-G	Leite desnatado cru readicionado de gordura pasteurizada;
LDP-G	Leite desnatado pasteurizado readicionado de gordura pasteurizada;
TG	Termogravimetria;
DTG	Termogravimetria derivada;
DTA	Análise térmica diferencial;
DSC	Calorimetria exploratória diferencial;
ATCC	American Type Culture Collection;
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;
UFC	Unidade formadora de colnia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1 Leite Humano Ordenhado (LHO) .....	19
3.2 Pasteurização .....	18
3.3 Efeito Bifidogênico do Leite Humano .....	21
3.4 Principais Componentes Prebióticos do Leite Humano .....	21
3.4.1 Lactoferrina .....	22
3.4.2 Oligossacarídeos .....	23
3.4.3 Lisozima .....	25
3.5 Análises Térmicas.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1 Obtenção e Manutenção das Culturas de Bifidobactérias .....	29
4.2 Identificação das Bifidobactérias Isoladas de Origem Humana à Nível de Gênero .....	29
4.3 Padronização do Inóculo de Bifidobacterias .....	30
4.4 Fermentação de Diferentes Carboidratos por Bifidobactérias .....	30
4.5 Obtenção e Manutenção de Amostras de Leite Humano Ordenhado (LHO) .....	32
4.6 Pasteurização Lenta (LTLT) do Leite Humano Ordenhado (LHO) .....	32
4.7 Comparação do Efeito Bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Cru e Pasteurizado (Desnatados e Desnatados Readicionados de Gordura Pasteurizada) .....	33
4.8 Resistência de Bifidobactérias à lisozima .....	35
4.9 Quantificação de Lisozima no Leite Humano Ordenhado <i>in natura</i> e Pasteurizado (LTLT) .....	38
4.10 Análises Térmicas .....	39
5. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	41
5.1 Identificação das Bifidobactérias à Nível de Gênero .....	41
5.2 Efeito da Pasteurização sobre o Potencial Prebiótico do Leite Humano Ordenhado (LHO).....	43
5.3 Análise Térmica do Leite Humano Ordenhado (LHO) Cru e Pasteurizado .....	46
5.4 Análise Térmica dos Padrões de Lisozima e Lactoferrina.....	50
5.5 Resistência de Bifidobactérias à Lisozima .....	52
5.6 Quantificação da Atividade de Lisozima do Leite Humano Ordenhado (LHO) Cru e Pasteurizado .....	54
6. CONCLUSÕES .....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O leite humano ordenhado (LHO) é submetido, nos bancos de leite, ao processo conhecido como pasteurização lenta quando o leite é tratado a 62.5°C/30 minutos. Este processo visa à eliminação dos microrganismos patogênicos e a redução dos contaminantes a um nível aceitável, porém sabe-se que o tratamento térmico pode alterar as substâncias termossensíveis dos alimentos, portanto há necessidade de estudar as possíveis mudanças ocorridas na composição em ingredientes bioativos do leite humano pasteurizado estocado nos bancos de leite (BLH) comparando ao correspondente “*in natura*”.

Probióticos são microrganismos vivos que quando presentes em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), enquanto que prebióticos são definidos como um agente que, quando ingerido, promove o crescimento, estabelecimento e atividade de microrganismos probióticos (GIBSON E ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2007). Constituem-se principalmente de oligossacarídeos não digeríveis e seletivamente fermentados pelas bactérias intestinais, resultando na modulação desta microbiota.

O trato gastrintestinal do recém-nascido é estéril ao nascer, sendo rapidamente colonizado por microrganismos do meio ambiente ou da sua mãe. A contaminação com bactérias comensais e outros microrganismos derivaria da vagina, intestino e pele da mãe ou do ambiente e ocorreria logo após o nascimento.

Bifidobactérias são os principais constituintes da microbiota intestinal de lactentes saudáveis. O crescimento e a colonização do intestino por estas bactérias são estimulados pela alimentação com leite materno. O efeito bifidogênico, portanto prebiótico, da alimentação com leite materno foi identificado como sendo relacionado à presença de glicomacropéptido e oligossacarídeos no leite humano. Além destes, outros componentes com provável atividade bifidogênica são as enzimas lactoferrina e lisozima.

Para desempenhar um papel benéfico ao hospedeiro, bactérias probióticas precisam permanecer viáveis no trato intestinal. O leite humano contém quantidades expressivas de lisozima, enzima resistente à digestão que no trato intestinal exerce ação bactericida, atuando principalmente contra bactérias Gram positivas. Portanto, é necessário que bifidobactérias sejam resistentes às concentrações de lisozima presentes no leite humano para permanecerem viáveis e desempenharem o efeito probiótico desejado.

A capacidade de fermentar carboidratos complexos por bifidobactérias de origem humana também representa uma vantagem competitiva frente à bactérias patogênicas.

Antioxidantes como lactoferrina,  $\alpha$  tocoferol,  $\beta$  caroteno, cisteína, ácido ascórbico, ácido úrico, catalase e glutathione peroxidase estão presentes no leite humano (NETO, 2006) e presume-se que possam exercer efeito prebiótico frente a bifidobactérias por serem microrganismos anaeróbios. Reduções parciais ou totais nos componentes bioativos do leite humano, como lactoferrina, lactoperoxidase e retinol (vitamina A) devidas ao aquecimento, já foram relatadas.

As análises térmicas são ferramentas importantes para avaliação dos fenômenos físicos e químicos em amostras de natureza orgânica e inorgânica, podendo detectar eventos como desnaturação, oxidação e degradação de componentes bioativos. No entanto há poucas pesquisas utilizando estas técnicas para avaliar possíveis alterações nos ingredientes bioativos no leite humano pasteurizado.

Levando em consideração as preocupações apresentadas, acrescidas da dificuldade em se encontrar estudos que caracterizem analiticamente o potencial

bifidogênico do leite humano ordenhado, esse trabalho objetivou agregar conhecimento sobre a diferença, com relação aos compostos bioativos, entre o leite humano estocado nos bancos de leite humano e o “*in natura*”. Para tanto, o crescimento de isolados de bifidobactérias de origem humana foi avaliado “*in vitro*” em leite humano cru e pasteurizados, assim como frente a diferentes concentrações de lisozima. Em adição, técnicas de análise térmica foram usadas visando o monitoramento de alterações no perfil termogravimético do leite após pasteurização.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar, o efeito do processo de pasteurização lenta (LTLT) do leite humano sobre a composição e estabilidade térmica de seus componentes bioativos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar os isolados de bifidobactérias com base na produção da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase;
- Avaliar a resistência ou susceptibilidade das bifidobactérias frente a lisozima;
- Utilizar técnicas de análise térmica para avaliar possíveis mudanças ocorridas na composição em ingredientes bioativos do leite humano pasteurizado estocado nos bancos de leite comparado ao leite humano cru;
- Quantificar o crescimento de bifidobactérias isoladas de origem humana inoculada no leite humano cru e comparar com o crescimento obtido no leite humano submetido ao processo de pasteurização lenta (LTLT);
- Quantificar o teor de lisozima no leite cru e pasteurizado (LTLT) pelo método lisoplate.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leite Humano Ordenhado (LHO)

Hipócrates, na Idade Antiga, foi um dos pioneiros em reconhecer e escrever sobre os benefícios da amamentação, isto devido à observação da mortalidade dos recém-nascidos não amamentados ao peito. Galeno foi o primeiro a orientar que a alimentação infantil deve ser acompanhada por um médico. Com o advento do Cristianismo, a amamentação foi incentivada devido à proteção às crianças. Na idade moderna e contemporânea, houve um decréscimo na prática de amamentação, pois este ato não era mais visto com admiração pela elite europeia, com isso a mortalidade infantil aumentou substancialmente. No início do século 20 a prática da amamentação decresceu ainda mais com a descoberta da pasteurização e das fórmulas de leite em pó. Iniciava-se a Era do aleitamento artificial, somando-se a isto, neste século a industrialização, a urbanização e o trabalho externo da mulher também contribuiu para esta redução. No Brasil, a amamentação esteve em baixa até final dos anos 70, quando a prática passou a ser incentivada pelos organismos internacionais e colegiados médicos. Devido às dificuldades da prática de amamentação e para suprir a necessidade de lactentes que necessitavam permanecer nos hospitais, houve a criação de bancos de leite humano (VINAGRE et al., 2001).

O leite humano contém todos os nutrientes necessários nos primeiros seis meses de vida, sendo o alimento ideal e único para o recém-nascido. O leite humano é constituído de uma série de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, enzimas, hormônios, imunoglobulinas, além de vários fatores de proteção e nutrição. A água é o maior constituinte sendo de, aproximadamente 87,2 g/dL; 86,4 g/dL e 87,6 g/dL no colostro, leite de transição e no leite humano maduro, respectivamente. A quantidade de lipídios é em média de 1,85 a 2,9 g/dL no colostro, de 2,9 a 3,6 g/dL no leite de transição e de 3,0 a 3,8 g/dL no leite humano maduro. Dentre os ácidos graxos saturados presentes no leite humano ordenhado, há prevalência de láurico, mirístico, palmítico e esteárico; dentre os ácidos graxos insaturados estão o palmitoléico, oleico, linoleico e linolênico. Dentre os carboidratos, o mais abundante é a lactose, cuja concentração é de 7,0 g/dL e 5,0 g/dL no leite maduro e no colostro, respectivamente. Dentre as proteínas do leite humano, a que representa a maior fração é a caseína, aproximadamente 1,2 g/dL, 0,7 g/dL e 0,25 g/dL, no colostro, leite de transição e no leite humano maduro, respectivamente, seguido da lactoalbumina, que está ausente no colostro e em aproximadamente 0,8 g/dL no leite de transição e 0,3 g/dL, no leite humano maduro. (LAURINDO, 1991). As proteínas do leite humano são divididas em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As frações proteicas presentes no soro do leite são: beta-lactoalbumina, alfa-lactoalbumina, imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e glicomacropéptidos, que são geradas a partir de sub-frações de muitas proteínas (MAHLER, 2008).

O leite humano possui quantidades menores de fosfato e proteína comparados ao leite de vaca. No leite humano há 0,15 g/L de fosfatos e 9,0 g/L proteínas, já no leite de vaca, a quantidade é de 0,9 g/L e 32 g/L, respectivamente. De acordo com Coppa et al. (2006) justamente a baixa concentração de proteínas e fosfatos presentes no leite humano associadas a combinação de várias substâncias influencia positivamente o crescimento de *Bifidobacterium spp.*

Segundo dados da Rede de Bancos de Leite Humano do Brasil, no ano de 2013, compunha-se de 206 bancos de leite humano (BHL) e 108 pontos de coleta (PC), distribuídos por região da seguinte forma: região sudeste (88 BLH e 49 PC), região

nordeste (50 BLH e 35 PC), região sul (29 BHL e 7 PC), região centro oeste (27 BLH e 6 PC) e região norte (12 BLH e 11 PC). O volume de leite humano anual, em litros, coletado (LC) e distribuído (LD), foram: 2006 (150.046,4 LC e 113.828,3 LD), 2007 (148.948,5 LC e 109.505,3 LD), 2008 (164.531,1 LC e 124.923,1 LD), 2009 (166.985,8 LC e 128.753,7 LD), 2010 (165.113,6 LC e 126.036,5 LD) e em 2011 (158.494,2 LC e 123.742,9 LD).

Sabe-se que o leite humano confere proteção específica contra vírus e bactérias, pois contém uma série de anticorpos e também possui uma variedade de fatores não específicos que seleciona o crescimento de diferentes microrganismos e também confere proteção contra infecções. Estes fatores específicos incluem ferro ligado a proteínas, vitamina B12 e folato e também enzimas com potencial antimicrobiano como lisozima e lactoperoxidase (REITER, 1976).

No Quadro 1 estão apresentadas as funções gerais das enzimas do leite humano.

**Quadro 1** – Funções gerais das enzimas do leite humano

<b>Enzima</b>	<b>Funções</b>
Lisozima Peroxidase Lipase lipoproteica e lipase digestiva	Proteção contra bactérias e vírus
Amilase Lipase digestiva	Digestão
Sulfidrila oxidase	Reparo
Glutationa peroxidase Fosfatase alcalina Oxidase xantina	Transporte de metais
Fosfoglucomutase Sintetase lactose Sintetase ácido graxo Tiosterase	Biossíntese de componentes do leite
Fosfoglucomutase	Síntese de galactose
Galactosiltransferase	Síntese de lactose
Lipase lipoproteica	Regulação da transferência de triglicérides, colesterol e fosfolípidios do sangue para o leite
Antiproteases	Proteção da glândula mamária de proteólise (leucócitos e lisossomos)
$\gamma$ Glutamyltransferase	Endo e exocitose de proteínas
Oxidase xantina	Secreção de gotículas de gordura do leite
Sintetase ácido graxo	Lipogênese
Tiosterase	Lipogênese

Fonte: Hamosh, 1995.

Hayashi et al. (1994) estudaram o efeito da fortificação do leite humano com suplemento proteico mineral (0,7 g/dL de proteína, 0,09 g/dL de cálcio, 0,045 g/dL de

fósforo) em recém-nascidos de peso muito baixo ( $\leq 1300$  g). Os recém-nascidos foram divididos em dois grupos, um controle que foi alimentado somente com leite humano e outro alimentado com leite humano fortificado. A retenção de nitrogênio no grupo que recebeu leite humano fortificado foi significativamente comparado ao grupo alimentado com leite humano ordenhado sem fortificação.

Lucas et al. (1980) propuseram como alternativa para adequar o leite humano para recém-nascidos de muito baixo peso, a adição de gordura oriunda de leite humano previamente desnatado por centrifugação e proteína de leite humano seca obtida por diálise. Obteve-se melhora no conteúdo de proteína, gordura, lactoferrina e imunoglobulina A.

O leite humano possui um complexo sistema enzimático que pode ser dividido em três grupos: aquelas que possuem função na glândula mamária, enzimas que podem ser funcionais ao bebê e enzimas presentes no leite que possuem mecanismos de ação ainda desconhecidos.

### 3.2 Pasteurização

Os bancos de leite humano no Brasil foram criados visando mais as propriedades farmacológicas do que as qualidades nutricionais, pois 85% dos óbitos, decorrentes da desnutrição nos lactentes desmamados, estavam relacionados com a alimentação artificial. Em consequência da grande mortalidade associada à alimentação artificial, houve necessidade da criação de um estoque de leite humano. Depois de tomados todos os cuidados com a saúde da doadora e a assepsia da coleta, o leite era distribuído *in natura*. Com o aumento do volume de leite coletado, tornou-se necessário a sua estocagem e tratamento térmico (MAIA et al., 2006).

A pasteurização é um tratamento térmico que emprega temperaturas abaixo de  $100^{\circ}\text{C}$  e que elimina a maioria dos microrganismos presentes no alimento. Como não é um processo que elimina todos os microrganismos, os alimentos submetidos à pasteurização são complementados com outro tipo de conservação: refrigeração, adição de açúcar, utilização de anaerobioses, etc. O tempo e a temperatura empregados na pasteurização do leite dependem do método e do produto a ser tratado. O processo de pasteurização lenta LTLT (Low Temperature, Long Time) do leite é definido como o tratamento térmico que emprega o binômio tempo x temperatura de  $62^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos (GAVA, 2009).

Segundo as Normas Técnicas para Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira (IFF), a pasteurização do leite humano ordenhado é o:

*“tratamento térmico, conduzido a  $62,5^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, aplicado ao leite humano ordenhado, com o objetivo de inativar 100% dos microrganismos patogênicos e 99,99% da microbiota saprófita, equivalendo a um tratamento 15D para inativação térmica da *Coxiella burnetti*”* (ALMEIDA, et al., 2005).

O tempo é definido pelas Normas Técnicas para o Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira (IFF), como: *“período compreendido entre o momento da colocação dos frascos a serem pasteurizados no banho-maria até a estabilização da temperatura do banho em  $62,5^{\circ}\text{C}$ .”*

O procedimento para pasteurizar o leite humano ordenhado deve ser o seguinte:

“Regular o banho maria à temperatura de tratamento (62,5°C) e esperar que o mesmo se estabilize; carregar o banho maria com a capacidade máxima de frascos por ela comportado (os frascos deverão conter o mesmo volume de leite humano ordenhado; deverão estar termicamente estabilizados a uma mesma temperatura, recomenda-se utilizar 5° C; o frasco que ocupar a posição central do banho-maria deverá conter um termômetro para medir a temperatura do leite e funcionará como controle; o bulbo do termômetro deverá estar posicionado no ponto frio do frasco, que situa na parte central, a uma altura equivalente a 2/3 da coluna de líquido, medido da superfície em relação ao fundo); iniciar a marcação do tempo imediatamente após carregar o banho-maria com todos os frascos, o tempo final de pré-aquecimento será determinado quando a temperatura final do frasco controle atingir 62,5° C; os frascos deverão ser agitados manualmente ou em intervalos regulares de 5 minutos; iniciar a marcação do tempo de letalidade térmica (30 minutos) a partir do momento que a temperatura do leite humano atingir a marca de 62,5° C; transcorrido os 30 minutos de letalidade térmica, promover o resfriamento dos frascos até que o leite humano atinja uma temperatura igual ou inferior a 5° C, o resfriamento dos frascos pode ser obtido através de resfriadores automáticos ou pela imersão dos mesmos em um banho contendo água e gelo” (ALMEIDA, et al., 2005).

A pasteurização lenta, feita a 62,5°C/30 minutos, afeta os constituintes bioativos termo lábeis do leite humano. O efeito da pasteurização sobre alguns constituintes bioativos presentes no colostro humano estão apresentadas no Quadro 2.

**Quadro 2** – Efeito da pasteurização sobre constituintes bioativos do colostro humano.

Fatores	Ação Antimicrobiana	Efeito do calor
SlgA	Transporte transluminar, neutralização e ativação do complemento	Estável a 56°C e perda de 0 a 30% a 62,2°C por trinta minutos
IgM e IgG	Neutralização e ativação do complemento	IgM destruída e IgG diminuída a 1/3 a 62,5°C por trinta minutos
Fator de crescimento <i>Bifidobacterium</i>	Bacteriostática	Estável
Lisozimaa e lactoperoxidase	Bacteriostática e anti-inflamatória	Perda parcial a 56°C por trinta minutos
Complemento	Lise, opsonização e neutralização viral	Destruído após 56°C por trinta minutos
Lactoferrina	Bacteriostática	66% destruída após trinta minutos a 62,2°C
Citocinas	Imunomodulação e antialergia	Desconhecido
Lípides	Lise	Estáveis
Macrófagos, neutrófilos e linfócitos	Fagocitose, imunomodilação e produção de anticorpos	Destruídos a 62,5°C por trinta minutos

Fonte: Ogundele, 2000

A pasteurização do leite humano reduziu aproximadamente 5,5% e 3,9% dos teores de lipídios e proteínas, respectivamente, já o teor de lactose não foi significativamente afetado (VIEIRA, 2011). Coppa et al. (2006) estudou sobre o possível potencial bifidogênico da lactose, observando um incremento no crescimento de bifidobactérias em animais. Porém o mesmo efeito não foi observado ao estudar o potencial bifidogênico na microbiota intestinal (SCHULZE e ZUNFT, 1991).

### 3.3 Efeito Bifidogênico do Leite Humano

Entre as 30 espécies de bifidobactérias conhecidas, 10 são de origem humana (*B. adolescentes*, *B. angulatum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. globosum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudolongum* e *B. bifidum*), 17 de origem animal, duas de águas residuais e uma de leite fermentado (GOMES e MALCATA, 1999).

O estabelecimento inicial de bifidobactérias em recém-nascidos é um papel do leite humano, este atua como fonte de microrganismos em um mecanismo ainda desconhecido e posteriormente beneficia nutricionalmente esta classe de microrganismos. Do primeiro ao décimo dia de vida os microrganismos mais frequentemente isolados de fezes de recém-nascidos constituem-se de *Enterococcus* e *Streptococcus*; do décimo dia até três meses, as bifidobactérias passam a ser predominantes. No leite humano, frequentemente são isolados *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, isto pode contribuir para o estabelecimento da microbiota intestinal do recém-nascido (SOLIS et al., 2010).

Mazo (2009) pesquisou a capacidade de fermentação de diferentes carboidratos de três espécies de bifidobactérias, estas apresentaram resultados positivos para: ribose, galactose, D-glicose, D-frutose, D-manose, manitol, sorbitol, N-acetil-glicosamina, amidalina, esculina, salicina, celobiose, maltose, lactose, melibiose, sacarose, D-rafinose, D-turanose, duas culturas foram positivas para glicogênio e apenas uma positiva para L-fucose.

Degan e Macfarlane (1991) estudaram o perfil de fermentação de oito espécies diferentes de bifidobactérias em presença de arabinose, manose, galactose, glicose e xilose. Quando há concomitância destes carboidratos, a fermentação de uns inibe a fermentação de outros. As ordens de fermentação pelas respectivas espécies foram as seguintes: *Bifidobacterium bifidum* fermentou glicose, galactose e manose e houve inibição das pentoses; *Bifidobacterium longum* fermentou a glicose e xilose e houve inibição da galactose; *Bifidobacterium catenulatum* fermentou a glicose e houve inibição da galactose; *Bifidobacterium adolescentis* fermentou, simultaneamente, glicose e galactose e a arabinose foi inibida; *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium angulatum* fermentaram a glicose e a galactose; *Bifidobacterium pseudolongum* fermentou em ordem decrescente a galactose, glicose e xilose; *Bifidobacterium breve* fermentou a glicose e arabinose e houve inibição da manose.

### 3.4 Componentes Bioativos do Leite Humano

Substâncias prebióticas consistem fundamentalmente em polissacarídeos não-amino e oligossacarídeos mal digeridos pelas enzimas humanas, que beneficiam, nutricionalmente, um seletivo grupo de microrganismo que povoam o intestino, este seletivo grupo é composto por bactérias benéficas, chamadas de bactérias prebióticas (WGO, 2008).

### 3.4.1 Lactoferrina

Na estrutura tridimensional da lactoferrina há dois lóbulos separados, em um destes há N-terminal e no outro C-terminal. Estes estão conectados por uma curta  $\alpha$ -hélice e conduzem um átomo de ferro ligado em cada sítio que estão ligados coordenadamente a quatro ligantes: duas tirosinas, uma histidina e um aspartato (ANDERSON, 1987).

Segundo Coppa et al. (2006), o leite humano possui entre 1,3 e 2,8 g/L de lactoferrina, valor muito elevado comparado ao leite de vaca que possui somente traços deste componente.

Pressupõe-se que a lactoferrina indisponibilize o ferro livre para utilização do crescimento microbiano. Estudos com *Bifidobacterium bifidum* mostraram que não há utilização do ferro para o seu crescimento, portanto, há hipótese de que a lactoferrina beneficie o desenvolvimento de bifidobactérias na medida em que reduz a utilização do ferro para outras bactérias, como a *Escherichia coli* e fungos (MAHLER 2008; BULLEN et al., 1972).

Anderson et al. (2000) pesquisaram o efeito fungistático e fungicida da lactoferrina em *Candida albicans*. Foi verificado efeito fungistático ao utilizar doses superiores a 15 mg/L. A utilização de doses de 0,15 e 1,5 mg/L favoreceu o crescimento à medida que a utilização de baixas doses é insuficiente para haver ligação com ferro e desta forma ela pode ser utilizada como substrato energético pelos fungos.

Além da privação do ferro, a lactoferrina possui ação bacteriostática, bactericida, viricida, fungicida, estimula a imunidade e bloqueia a produção de citocinas pró inflamatórias (NETO, 2006). A lactoferrina pode atuar também como agente bactericida em bactérias Gram negativas, aparentemente devido à interação com os lipopolissacarídeos da superfície dessas bactérias (DRAGO et al., 2011). Dionysius et al. (1993) encontraram ação bactericida desenvolvida por apo-lactoferrina bovina sobre *Escherichia coli*, utilizando concentrações 0,4 a 1,0 g/L, este mesmo efeito não foi observado quando a concentração utilizada foi de 0,2 g/L. Esta ocorrência também foi observado quando a lactoferrina foi totalmente saturada com zinco.

Cerca de 6 a 10 % da lactoferrina não é digerida pelo trato intestinal, pressupondo que possa chegar até ao colon e desempenhar atividades prebióticas (DAVIDSON; LONNERDAL, 1987).

O conteúdo de lactoferrina no leite humano varia de acordo com a alimentação da mãe e com o período de lactação. Hennart et al. (1991) pesquisaram o conteúdo de lactoferrina em mães habitantes de áreas urbanas que possuíam índice de massa corpórea  $22,6 \pm 2,6 \text{ Kg/m}^2$  com o teor de lactoferrina do leite de mães de áreas rurais com índice de massa corpórea de  $20,5 \pm 2,2 \text{ Kg/m}^2$ , os conteúdos de lactoferrina foram 0,70 e 0,60 g/L, respectivamente. Verificou-se também durante o primeiro ano de lactação, que houve redução de 33 e 55% na concentração de lactoferrina no leite humano de mães de áreas urbanas e rurais, respectivamente.

Jovaní et al. (2003) estudaram a adição de lactoferrina em fórmulas infantis com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade do ferro, porém a adição foi indiferente, porém houve segregação do ferro para o crescimento microbiano e para as reações de oxidação lipídica.

### 3.4.2 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são carboidratos que contêm de 3 a 10 monossacarídeos, sendo capazes de resistir à digestão e chegar até ao intestino onde beneficiam o crescimento de bifidobactérias. São, portanto, consideradas substâncias prebióticas e com potencial bifidogênico (ENGFER et al, 2000).

Os oligossacarídeos são o terceiro maior componente do leite humano (ZIVKOVIC et al,2011; LOCASCIO et al., 2007). A composição de macronutrientes do leite humano é de 70 g/L de lactose, 40 g/L de lipídios, 8 g/L de proteínas e 5-15 g/L de oligossacarídeos. O total de oligossacarídeos foi classificado por suas massas moleculares, obtendo as percentagens de: massa molecular de 709,3 g/mol (17%); massa molecular de 855,3 (1%); massa molecular de 1074,4 (8%); massa molecular de 1220,4 (20%); massa molecular de 1366,5 (11%); massa molecular de 1511,6 (3%), massa molecular de 1585,6 (5%); massa molecular de 1731,6 (6%); massa molecular de 1877,7 (4%); massa molecular de 2096,7 (3%) e outros (23%) (NINONUEVO, 2008).

Os oligossacarídeos são formados por ligações covalentes entre D-glucose, D-galactose, N-acetilglucosamina, L-fucose e N-acetil-neuraminicácido. Suas ligações formam os seguintes oligossacarídeos: dois isômeros com massa molecular 709,3 g/mol, lacto-N-tetraose e lacto-N-neotetraose; quatro isômeros com massa 855,3 g/mol, lacto-N-fucopentaose I, II, III e IV paralacto-N-hexaose, isômero 3 fucosil-paralacto-N-hexaose.II, III e IV; cinco isômeros com massa 1220,4 g/mol, monofucosil-lacto-N-hexaose I e III, monofucosil-paralacto-N-hexaose IV, isômero 1 fucosil-paralacto-N-hexaose, isômero 3 fucosil-paralacto-N-hexaose e com massa 1511,6 g/mol, monofucosilmonosialil-lacto-N-hexaose (ZIVKOVIC, 2011). A quantidade de oligossacarídeos varia de acordo com o estágio de lactação e também de lactente para lactente (BODE, 2006).

Coppa et al. (2006) documentaram em suas revisão bibliográfica que os oligossacarídeos presentes no leite humano possuem atividade prebiótica, devido aos fatores de resistência a digestão, efeito *in vitro*, e triagem clínica, além do efeito prebiótico documentado em trabalhos científicos.

Mais de 200 oligossacarídeos já foram identificados no leite humano, sendo que a maioria contém lactose e um ou mais monossacarídeos, como a D-glucose, D-galactose, N-acetilglucosamina, L-fucose e ácido siálico. Também há os oligossacarídeos de cadeia curta, como os trissacarídeos 3'sialactose, 6' sialactose, 2' fucosiolactose e 3' fucosiolactose e outros oligossacarídeos mais complexos que contém acima de 15 unidades de monossacarídeos (BODE, 2009).

Segundo Asakuma et al. (2008), mais de 130 tipos de oligossacarídeos foram isolados do leite humano, dentre eles estão lacto-N-tetraose (Gal $\beta$ 1, 3GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1,4Glc), lacto-N-fucopentaose I (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 3GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc), lacto-N-difucohexaose I (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 3[Fuc $\alpha$ 1,4]GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1,4Glc) e 2'-fucosyllactose (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 4Glc), sabe-se que são abundantes, especialmente em colostro.

Crociani et al. (1994) estudaram a fermentação de vários substratos ( $\alpha$ -L-fucose, D-galactosamina, D-glucosamina, D-glucuronate, amilopectina, amilose, arabinogalactana, pectina, xilana, goma arábica, guar, tracanta e locusta) por linhagens de bifidobactérias de origem humana e animal. Os substratos D-galactosamina e D-glucosamina, amilose e amilopectina foram os substratos mais fermentados.

Coppa et al. (2006) estudaram o possível potencial bifidogênico da lactose e observou um incremento no crescimento de bifidobactérias em animais. Porém este

efeito não foi observado na composição da microbiota intestinal (SCHULZE e ZUNFT, 1991).

O acompanhamento do perfil de glicose mostrou que muitas linhagens de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* consomem pequena massa de oligossacarídeos que são abundantes no início do ciclo de lactação (LOCASCIO et al., 2007; ZIVKOVIC et al., 2011).

Rockova et al (2011) acompanharam por cromatografia de alta eficiência, o consumo dos oligossacarídeos de leite humano (HMO) por cinco linhagens de bifidobactérias de origem humana e duas de origem animal. Foi constatado que as linhagens de origem humana utilizam maior quantidade destes oligossacarídeos que as linhagens de origem animal. Além disso, HMO são mais específicos para bifidobactérias de origem humana comparado aos frutooligossacarídeos (FOS).

O possível efeito prebiótico dos oligossacarídeos do leite humano está apresentado no Quadro 1.

**Quadro 3** – Possíveis efeitos prebióticos dos oligossacarídeos do leite humano.

Efeito Possível	Local de atuação no organismo	Hipótese de mecanismo
Prebiótico e bifidogênico	cólon	Os oligossacarídeos são degradados e no cólon promovem o crescimento de microrganismos preferenciais
Antiaderente e antimicrobiano	Laríngeo-faríngeo, estômago, intestino curto, cólon e trato urinário	Os oligossacarídeos se aderem a ligantes específicos da superfície das células epiteliais do recém-nascido e inibem a ligação de microrganismos patogênicos.
Modificante do glicoma	Intestino ou outros órgãos	Os oligossacarídeos alteram expressivamente a glicosiltransferase e consequentemente modificam o glicoma das células.
Imunomodulatório	Sistema imune de inflamação de tecidos	Os oligossacarídeos reduzem a formação inicial de complexo plaqueta-neutrófilo, ativa leucócitos e a transmigração.
Não conhecido	Não conhecido	Os oligossacarídeos interferem em interações com outras proteínas e carboidratos.

**Fonte:** Bode, 2006.

O perfil de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias de origem humana foi estudo por Biavati e Mattarelli (2006), conforme mostrado no Quadro 4.

**Quadro 4** – Perfil de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias de origem humana.

<i>Bifidobacterium</i>	LACTOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	CELOBIOSE	SALICINA	SORBITOL	MANITOL	AMIDO	TREALOSE	RAFINOSE	GALACTOSE	MALTOSE	FRUTOSE	SACAROSE
<i>Bifidum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Longum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Infantis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Breve</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Angulatum</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Catenulatum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Dentium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Globusom</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
+	90% ou mais são positivas														
-	90% ou mais são negativas														
+	11 a 89% são positivas														

Fonte: Biavati e Mattarelli, 2006.

Rockova et al. (2011) acompanhou, por cromatografia de alta eficiência, o consumo dos oligossacarídeos isolados do leite humano por cinco linhagens de bifidobactérias de origem humana e duas de origem animal. As bifidobactérias de origem humana utilizam maior quantidade de oligossacarídeos que as linhagens de origem animal e os oligossacarídeos parecem ser mais específicos para bifidobactérias de origem humana que os frutooligossacarídeos.

Segundo Krause et al. (1996), a alimentação com leite humano estimulou significativamente o crescimento de bifidobactérias, comparado com a alimentação utilizando leite de vaca e de cabra. Quando a alimentação foi efetuada com leite humano, a contagem de bifidobacterias no ceco atingiu 10 ciclos logarítmicos, enquanto que a alimentação feita com leite de vaca ou cabra, a contagem obtida foi de 9 ciclos. A contagem de bifidobactérias no colon também foi estimulada quando a dieta foi efetuada com leite humano comparado à dieta com leite de vaca e de cabra.

### 3.4.3 Lisozima

A lisozima foi descoberta em 1922, por Alexandre Fleming ao observar que seu muco nasal, após um espirro que caiu sobre uma placa com bactérias, era capaz de causar a lise delas. No início houve bastante entusiasmo por parte do inventor com a possível utilização terapêutica da lisozima e de fato ele acreditava que alguns microrganismos poderiam produzi-la, mas em 1928 Alexandre Fleming descobriu a penicilina e devido ao sucesso deste antibiótico a lisozima caiu em declínio relativo.

Jollès e Canfield (1963), independentemente, descreveram a estrutura primária da lisozima do leite humano contendo 129 aminoácidos. Quando comparado com lisozima de aves havia uma inserção e uma deleção na sequência, cuja posição mais provável parecia ser no resíduo nº 48 e no resíduo nº 100, respectivamente.

Thomsen et al. (1972) demonstraram que a lisozima humana não apresentava a deleção depois do resíduo nº 100 quando comparado com lisozima de aves e propôs a seguinte sequência a partir do aminoácido 98: arginina-valina-valina-arginina-asparagina-prolina.

Bezkorovainy (1977) publicou que a lisozima do leite humano é composta por 130 resíduos de aminoácidos, apresenta peso molecular de 14,4 KDa e que a sequência de aminoácidos exibiu considerável homologia com a lisozima de ovo de galinha. Dubois et al. (1982) publicaram que há diferenças entre a estrutura terciária das duas proteínas o que resulta em grande organização e hidrofobicidade da lisozima do leite humano.

Os estudos de sensibilidade de microrganismos a lisozima iniciaram em 1952, quando Salton (1952) demonstrou que a parede celular do *Micrococcus lisodeikticus*, hoje *Micrococcus luteus*, era substrato para lisozima.

Berger e Weiser (1957) propuseram a primeira indicação da ligação química atacada pela lisozima de ovo de galinha como sendo a ligação  $\beta(1, 4)$  do polímero N-acetil-D-glucosamina.

O mecanismo de ação da lisozima não estava totalmente esclarecido até os estudos de Phillips et al. (1964), quando a utilização da técnica de difração de raio x possibilitou a demonstração da estrutura tridimensional. A estrutura proposta neste momento foi uma molécula grosseiramente elipsoidal, medindo aproximadamente 45x30 Å, contendo uma profunda rachadura sobre um dos lados. A superfície da molécula é de natureza polar, porém o interior contém resíduos não polares.

Os estudos cristalográficos de Phillips et al. (1964) apresentaram que o trissacarídeo quitina está ligado à rachadura da lisozima, sendo que a terminação não redutora está localizada no topo em um subsítio designado A. Há mais dois subsítios na molécula, denominados como subsítios B e C. As interações entre enzima e substrato ocorrem através de seis ligações de hidrogênio e 40 ligações de Van der Waals, embora outras formações de complexos são possíveis através de movimentos conformacionais moleculares.

A atuação bactericida da lisozima de ovo ocorre nas posições entre os aminoácidos 98 e 112, mas o sítio ativo mesmo está localizado entre os aminoácidos 107 e 110 (PELLEGRINI et al., 1997).

A lisozima possui ação sobre a parede celular de bactérias, onde quebram as ligações glicosídicas  $\beta 1-4$ , entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina (JOLLÈS, 1964; GRASSI et al., 2001), potencializa a ação da Imunoglobulina A e do complemento, possui potencial anti-inflamatório que limita o fator quimiotático dos neutrófilos e a geração de radicais tóxicos durante a fagocitose, por isso protege as células intestinais (GRASSI et al., 2001). Como a lisozima atua na parede celular das bactérias, sua ação é mais efetiva em bactérias Gram positiva, pois as Gram negativas possuem uma membrana externa que dificulta o contato entre a lisozima e a parede celular (VALENTA et al., 1998).

### 3.5 – Análises Térmicas

Termogravimetria ou análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica destrutiva no ramo das análises térmicas, em que a variação da massa de uma amostra é monitorada em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. A variação pode ser analisada como perda ou a agregação de massa à amostra em temperaturas variadas. Inicialmente os métodos térmicos encontraram ampla aplicação tanto no controle de qualidade quanto na pesquisa de produtos industriais como polímeros, fármacos, argilas, minerais e ligas metálicas. Mais recentemente, esta técnica analítica vem sendo utilizada para alimentos (SkOOG, 2002).

Alterações na massa ocorrem quando a amostra perde material em um dos vários caminhos diferentes ou reage com a atmosfera circundante. Isto produz estágios de decomposição na curva termogravimétrica e picos na curva de termogravimetria derivada. Um número de efeitos diferentes pode causar na amostra perda ou mesmo ganho de massa e então produzir degraus na curva TGA. Estes incluem o seguinte:

- Evaporação de constituintes voláteis; secagem; desorção e adsorção de gases, perda de umidade e outras substâncias voláteis; perda de água de cristalização.
- Oxidação de metais no ar ou oxigênio.
- Decomposição oxidativa de substâncias orgânicas no ar ou oxigênio.
- Decomposição térmica em uma atmosfera inerte com formação de produtos gasosos. Em compostos orgânicos, este processo é conhecido como pirólise.
- Reações químicas heterogêneas dos gases constituintes da atmosfera circundante, por exemplo, reações de redução com gás purgado contendo hidrogênio. Além disso, reações em que um produto é expandido, por exemplo, reações de descarboxilação ou condensação.
- Materiais ferromagnéticos. As propriedades magnéticas de alguns materiais alteram com a temperatura (transição de Curie). Se a amostra é medida em um campo magnético homogêneo, a mudança na atração magnética até a transição causa um sinal na curva termogravimétrica (METLLER TOLEDO, 2011).

Se a amostra sofrer reações químicas, a região da temperatura em que a reação ocorre é muito dependente da razão de aquecimento. Em geral, razões altas de aquecimento causam reações em temperaturas mais altas. A escolha da razão de aquecimento é particularmente importante se reações secundárias ocorrem com temperaturas iniciais que a diferem de outras. Se a razão de aquecimento utilizada é imprópria, a reação pode sobrepor e não ser detectada. No entanto, é possível separar diferentes reações por seleção da razão de aquecimento favorável. Uma aproximação bastante diferente para separação de reações sobrepostas é baseada no uso de DTG com controle automático da razão de aquecimento: quanto mais rápido a alteração na massa, menor a taxa de aquecimento (METLLER TOLEDO, 2011).

Termogravimetria derivada (DTG) é a derivada primeira da curva termogravimétrica, em função do tempo ou da temperatura. Esta técnica auxilia a verificação da quantidade de estágios de decomposição presentes na curva da termogravimetria

A análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são as análises térmicas mais usadas em conjunto com TGA. O princípio básico delas é o mesmo da análise térmica, ou seja, obter informação através da mudança de temperatura, porém independem da variação de massa. Estas técnicas identificam transições de fase sem variação de massa. A principal função do acoplamento TGA-

DTA é prover maior resolução em temperaturas específicas nas quais a variação de massa é pequena e sucessiva deixando a visualização apenas pelo gráfico de massa por temperatura, típico da termogravimetria, muito difícil de ser interpretado. A contribuição da calorimetria exploratória diferencial é a medida de fluxo de calor podendo identificar com muita propriedade mudanças de fase sem que haja variação de massa que passariam despercebidas na termogravimetria, como mudanças estruturais, reações e transições sólido-sólido, cristalização, fusão, polimerização e reações catalíticas (HAINES, 1992).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e Manutenção das Culturas de Bifidobactérias

As culturas de bifidobactérias fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ e foram isoladas do intestino de lactentes de até duas semanas de idade, durante o trabalho de doutoramento de Oliveira (2011).

Além dos isolados, foram utilizados como padrão duas culturas comerciais: *Bifidobacterium lactis* (SACCO Com. Imp. Exp. de Alim. Ltda), *Bifidobacterium lactis* BB12 (Christian Hansen).

As culturas estoque foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo MRS adicionado de 15% (vol/vol) de glicerol estéril. Para tanto as culturas de bifidobactérias foram ativadas por três transferências sucessivas em caldo MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a  $36^{\circ}\text{C}$  em jarra de anaerobiose. A última ativação foi feita em 10 mL do mesmo caldo. Este foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e o pellet reconstituído com o mesmo caldo adicionado de 15% de glicerol estéril e distribuído em quantidades de 1 mL em tubos de Eppendorff.

No momento da sua utilização, as culturas foram descongeladas e centrifugadas a 10.000g por 6 minutos, desprezado o sobrenadante e o pellet reconstituído com caldo MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a  $36^{\circ}\text{C}/24$  horas em jarra de anaerobiose. Este procedimento era repetido consecutivamente por três vezes.

No momento da utilização, a ativação das culturas foi realizada por três transferências sucessivas em caldo MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a  $36^{\circ}\text{C}$  por 24 h. em jarra de anaerobiose.

### 4.2 Identificação das Bifidobactérias Isoladas de Origem Humana à Nível de Gênero

Para a identificação das bifidobactérias à nível de gênero, foi utilizada a técnica descrita por Scardovi (1986). Resumidamente, as culturas foram inoculadas em 20 mL de caldo TPY (Trypticase-Fitona-Extrato de levedura) e incubadas anaerobicamente a  $36^{\circ}\text{C}/24$  horas. Seguiu-se centrifugação; lavagem dupla com solução tampão fosfato pH 6,5 + 500 mg/L de cisteína (Vetec); rompimento das células para liberação da enzima usando sonicador (UNIQUE, São Paulo) em banho de gelo por 15 minutos, utilizando potência de 90% e ponteira inserida 5 mm na suspensão celular; ao extrato resultante do rompimento foi adicionado 0,25 mL de cada uma das soluções: solução A (6 mg NaF (Sigma Aldrich) e 10 mg Na iodoacetato (Sigma Aldrich) em 1 mL de água destilada) e solução B (7 frutose-6-fosfato (Sigma Aldrich) a 80 mg/mL em água destilada); seguiu-se incubação a  $37^{\circ}\text{C}/30$  minutos; a reação foi terminada com adição de 1,5 mL de hidroxilamina HCL (Sigma Aldrich) a 13,9 g/100mL de água destilada previamente neutralizada com NaOH (Vetec) a pH 6,5; após repouso à temperatura ambiente por 10 minutos foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (Sigma Aldrich) a 15% em água destilada, 1 mL de ácido clorídrico (Vetec) a 4M. Finalmente adicionou-se 1 mL da solução de desenvolvimento de cor, ferricianeto hexahidratado (Sigma Aldrich) a 5% em ácido clorídrico (Vetec). O desenvolvimento de cor violácea avermelhada imediatamente após agitação dos tubos indicou a presença de frutose-6-fosfocetolase, enzima única do gênero *Bifidobacterium*.

### 4.3 Padronização do Inóculo de Bifidobactérias

Para cada cultura de bifidobactéria, foi determinada a equação de regressão linear relacionando absorbância com UFC/mL que permite conhecer o valor do inóculo a ser usado. A suspensão de células obtida da terceira transferência em caldo MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) foi centrifugado e lavado duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,2. Diluições de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 foram preparadas em tampão fosfato pH 7,2 e o valor da absorbância de cada diluição determinado em espectrofotômetro (1105, BEL PHOTONICS SP, USA) a 480 nm. Ao mesmo tempo foi feita a contagem de células por inoculação de diluições seriadas em Agar MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a 36°C em jarra de anaerobiose. A curva foi linearizada de forma a obter uma equação de 1° grau.

### 4.4 Fermentação de Diferentes Carboidratos por Bifidobactérias

Vinte e sete culturas de bifidobactérias, vinte e cinco isoladas intestinais de lactentes e duas comerciais foram testados quanto a capacidade de fermentar diferentes carboidratos.

Preparou-se solução a 11% dos seguintes carboidratos: lactose, L-arabinose, xilose, manose, celobiose, salicina, sorbitol, manitol, amido, trealose, rafinose, lactulose, galactose, maltose, frutose, sacarose, glicose, sorbose, esculina e ramnose. Estes foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

Foram preparados 20 frascos Erleynmeyer contendo exatamente 44 mL de caldo MRS sem adição de glicose e proteose de peptona. Adicionou-se em cada frasco 5 mL da solução de carboidrato e 1 mL da solução de púrpura de bromocresol a 0,16%, também esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Dois tubos com o crescimento da terceira transferência foram centrifugados, desprezado o sobrenadante e o pellet lavado duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente, a massa celular de um dos tubos foi utilizada para padronização do inóculo em *ca* 10<sup>8</sup> UFC/mL ressuspendendo-a em volume suficiente de tampão fosfato. Ao outro, que serviu de inóculo, adicionou-se o mesmo volume do caldo MRS sem glicose e proteose de peptona.

Alíquotas de 0,9 mL de cada frasco Erleynmeyer contendo os diferentes açúcares foram transferidas para 27 tubos Eppendorff, os quais foram inoculados com 0,1 mL da suspensão celular de cada cepa de *Bifidobacterium*.

Na Figura 1 está ilustrado o esquema de execução do experimento de fermentação de diferentes carboidratos..

CAPACIDADE DE FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES CARBOIDRATOS POR BIFIDOBACTÉRIAS

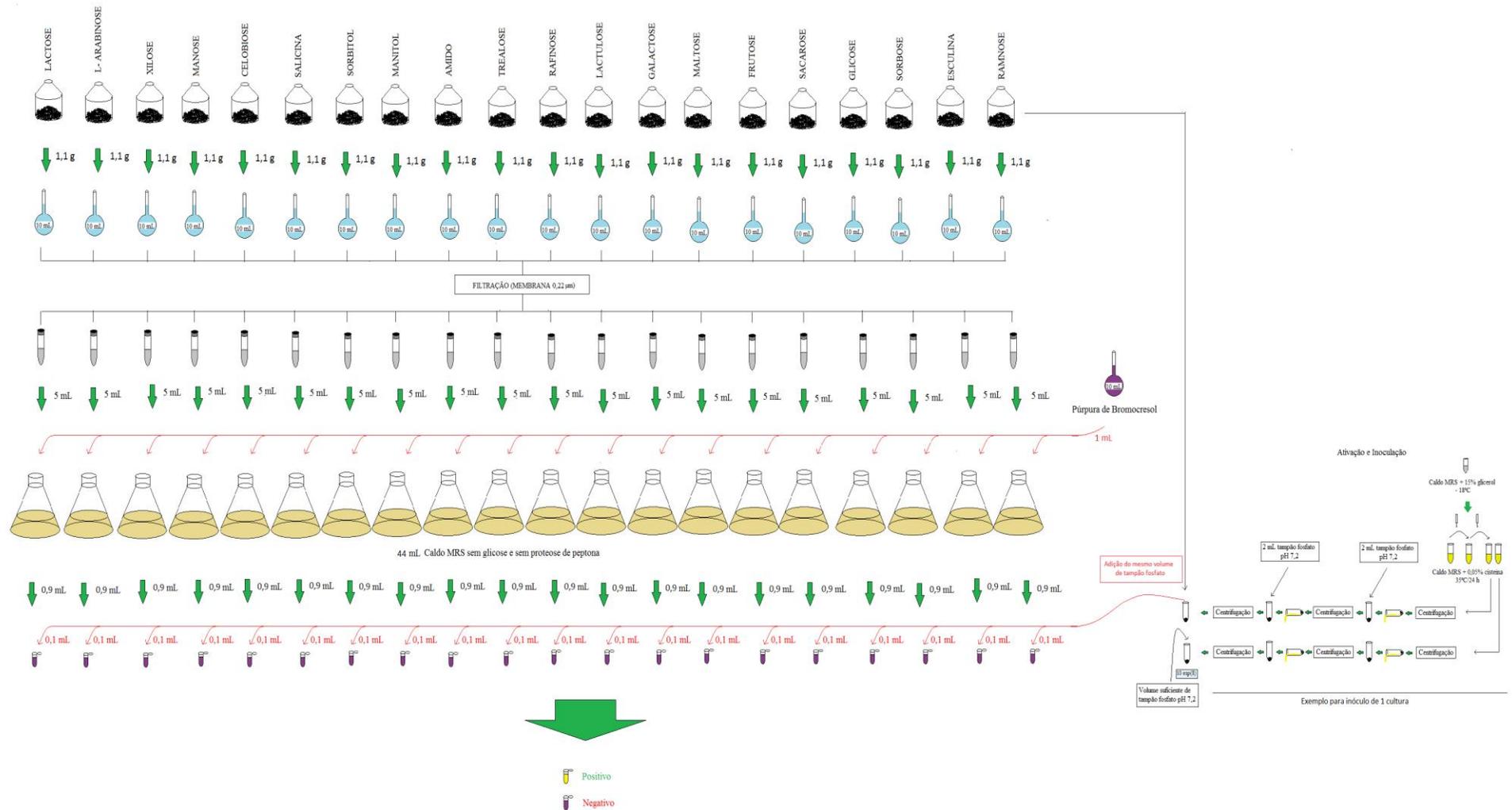


Figura 1 – Esquematização do experimento de capacidade de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.

Na Figura 2 é mostrada a galeria de tubos Eppendorff positivos e negativos para a fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.



**Figura 2** – Fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.

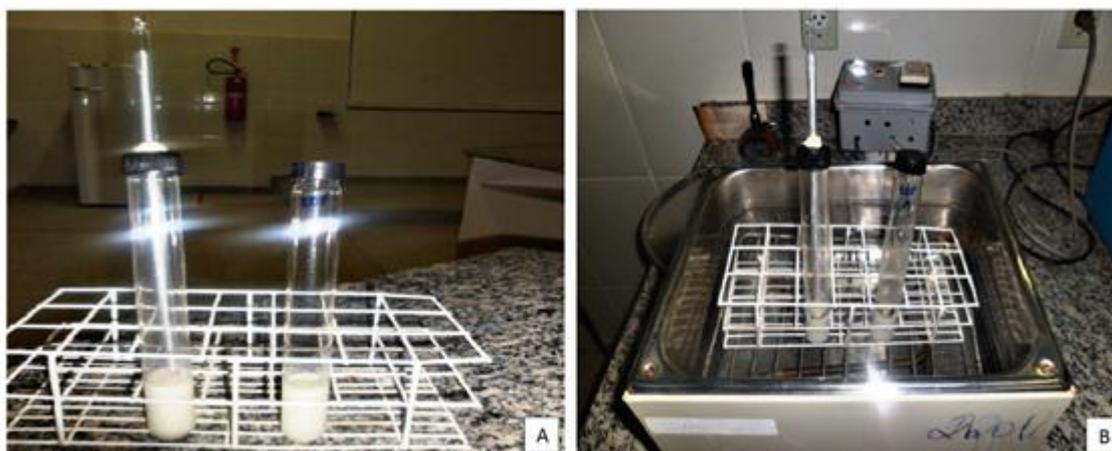
#### **4.5 Obtenção e Manutenção de Amostras de Leite Humano Ordenhado (LHO)**

Amostras de leite humano maduro, entre três e quatro meses de lactação, de duas doadoras codificadas como D1 e D2, ordenhado por expressão manual em suas próprias residências após a higienização dos mamilos com solução fisiológica e enxugamento com papel toalha, foram congeladas em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a ordenha. O transporte até o laboratório foi realizado em caixas isotérmicas contendo gelo, onde foi mantido estocado em freezer na mesma temperatura até o momento do uso. O descongelamento foi realizado em refrigerador por um período de 9 horas, seguindo instruções de Almeida et al. (2005).

#### **4.6 Pasteurização Lenta (LTLT) do Leite Humano Ordenhado (LHO)**

A pasteurização do LHO foi realizado em banho termostático de acordo com Almeida et al. (2005). Após estabilização do banho na temperatura de  $62,5^{\circ}\text{C}$  inseriram-se os frascos contendo leite humano ordenhado *in natura* com as tampas afrouxadas de forma que o nível de água ficasse, pelo menos, 2 cm acima do nível de leite no interior dos frascos. O monitoramento da temperatura foi feito através de frasco testemunha contendo mesmo volume de leite humano e termômetro. Após a temperatura do frasco testemunha ter alcançado  $62,5^{\circ}\text{C}$ , procedeu-se a pasteurização por 30 minutos agitando os frascos em intervalos regulares de 3 minutos. Transcorridos os 30 minutos referentes à letalidade térmica, os frascos foram inseridos em banho contendo água e gelo até a temperatura do frasco testemunha atingir  $5^{\circ}\text{C}$ .

Na Figura 3 está mostrada a pasteurização do leite humano ordenhado.



**Figura 3** – Preparação das amostras de leite humano ordenhado para pasteurização (A) e pasteurização em banho termostático (B).

#### **4.7 Comparação do Efeito Bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Desnatado Cru e Pasteurizado re-adicionados ou não de Gordura Pasteurizada)**

Alíquotas de 6 mL de LHO foram transferidas, assepticamente, para dois tubos estéreis, sendo um deles submetido à pasteurização lenta a 62,5°C/30 minutos como descrita no item 4.6. O volume de cada um dos dois tubos foi distribuído em tubos Eppendorff estéreis e a seguir centrifugados a 21.000g em centrífuga refrigerada (2K15, Sigma Laborzentrifugen, Germany) para obtenção de leite desnatado. Com auxílio de pipeta Pasteur estéril, retirou-se a fase aquosa correspondente ao leite cru e ao leite pasteurizado que novamente foi reunida em dois tubos estéreis (LDC e LDP). O conteúdo dos dois tubos foi esterilizado por filtração através de membranas de 0,22 µm, e quantitativamente distribuído em tubos Eppendorff da seguinte forma:

- LDC 0,9 mL de Leite Desnatado Cru;
- LDP 0,9 mL de Leite Desnatado Pasteurizado;
- LDC-G 0,87 mL de Leite Desnatado Cru adicionada ao Eppendorff contendo gordura pasteurizada;
- LDP-G 0,87 mL de Leite Desnatado Pasteurizado adicionado ao Eppendorff contendo gordura pasteurizada.

O crescimento da terceira transferência das 27 culturas de bifidobactérias foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e o pellet lavado duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente, a massa celular foi ressuspensa em volume suficiente do mesmo tampão de forma a obter *ca* 10<sup>8</sup> UFC/mL de cada cultura de bifidobactéria. Esta suspensão foi diluída sucessivamente até *ca* 10<sup>4</sup> UFC/mL, através de transferências de alíquotas de 0,1 mL em tubos contendo 0,9 mL de tampão fosfato pH 7,2, a última diluição foi realizada em Leite Desnatado Cru e Leite Desnatado Pasteurizado. A seguir, alíquotas de 0,1 mL desta diluição foi inoculada à cada um dos quatro tubos (LDC, LDP, LDC-G e LDP-G).

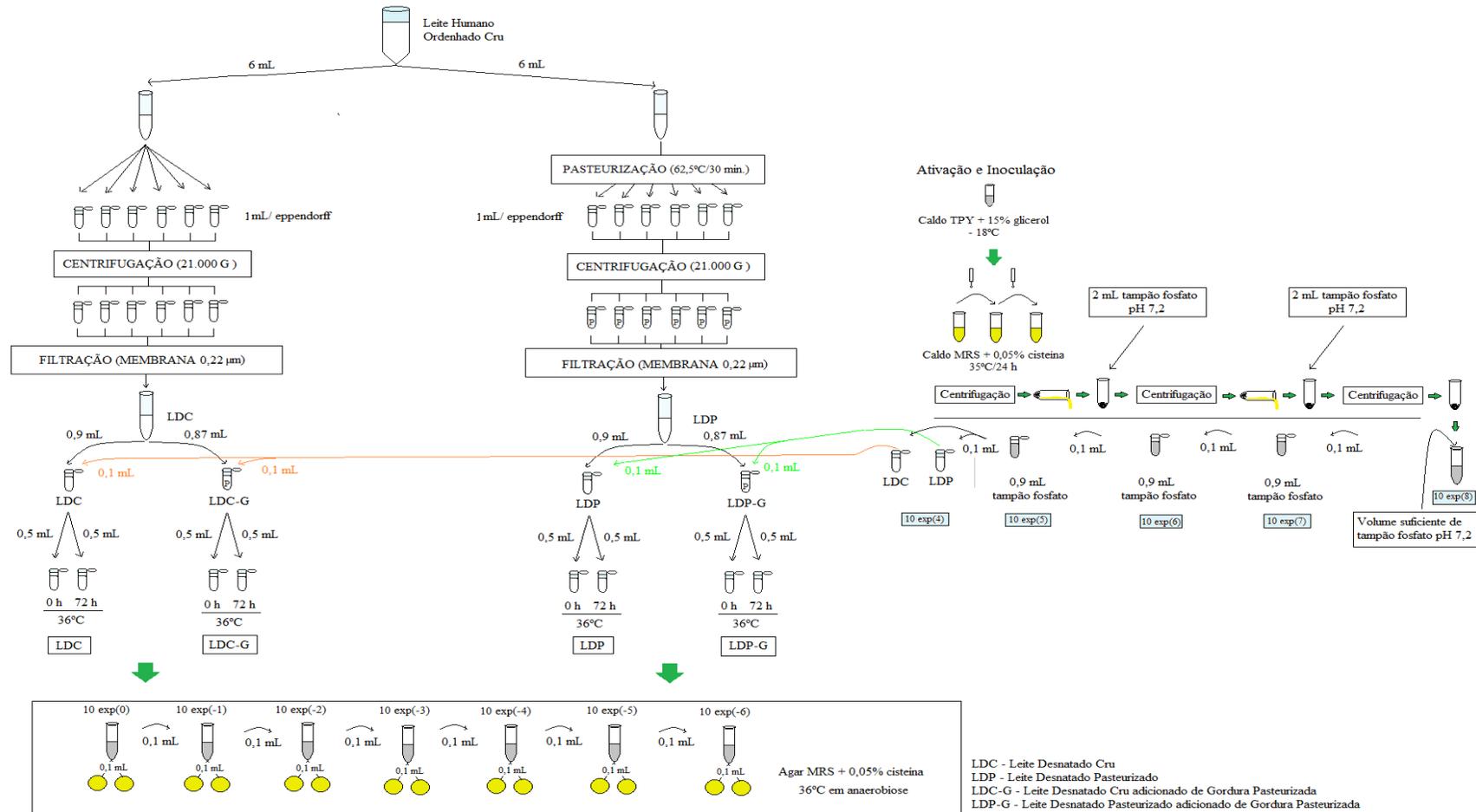
Após homogeneização, retirou-se alíquota de 0,5 mL do conteúdo de cada tubo Eppendorff para contagem inicial de bifidobactérias (tempo 0h) e a seguir os tubos foram incubados em uma câmara de anaerobiose (ELECTROTEK, Grã Bretanha) a 36°C por 72h. A contagem das bifidobactérias foi realizada por semeadura de diluições

sucessivas em Agar MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) com incubação em anaerobiose por 48 horas.

Os resultados foram analisados estatisticamente através no teste de ANOVA a 95% de confiabilidade (XLstat, versão 7.5).

Na Figura 4 está apresentado o esquema do experimento de comparação entre o efeito bifidogênico do leite humano ordenhado cru e pasteurizado (desnatados e desnatados readicionados de gordura pasteurizada).

PASTEURIZAÇÃO, DESNATE, FILTRAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BIFIDOBACTÉRIAS NO LEITE HUMANO ORDENHADO CRU E PASTEURIZADO (DESNATADOS E READICIONADOS DE GORDURA PASTEURIZADA)



**Figura 4** – Esquemática do experimento de comparação entre o efeito bifidogênico do leite humano ordenhado cru e pasteurizado (desnatados e desnatados re-adicionados de gordura pasteurizada)

#### 4.8 Resistência de Bifidobactérias à Lisozima

O crescimento da terceira ativação foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e o pellet lavado duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente, a massa celular foi ressuspensa em volume suficiente do mesmo tampão de forma a obter *ca*  $10^8$  UFC/mL.

Foram inoculados, quantitativamente, alíquotas de 0,15 mL de cada suspensão de células em dois frascos contendo 15 mL de caldo MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec). Estes foram incubados a 36°C em anaerobiose e após 2 horas adicionou-se a um dos frascos 0,6 mL de solução de lisozima (Sigma Aldrich) a 1% de forma a obter uma concentração final de 400 µg/mL e ao frasco controle, o mesmo volume de água destilada estéril. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas, assepticamente, em intervalos específicos por um período de 18 horas e mensurado a densidade ótica a 620 nm (1105, BEL PHOTONICS SP, USA).

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste de ANOVA a 95% de confiabilidade (XLstat, versão 7.5).

Na Figura 5 está apresentado o esquema do experimento da sensibilidade ou susceptibilidade de bifidobactérias a lisozima.

SENSIBILIDADE DE BIFIDOBACTÉRIAS A LISOZIMA

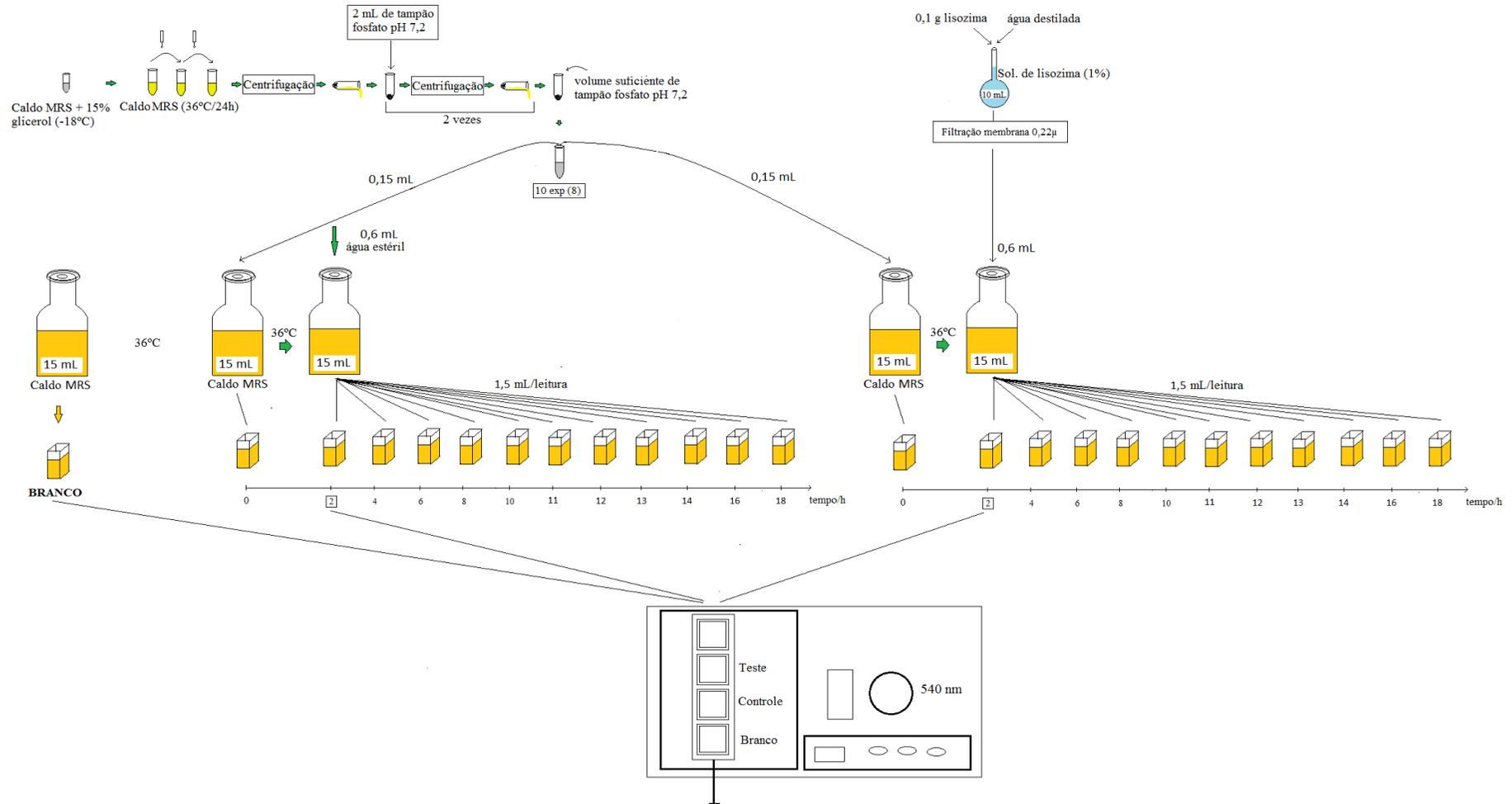


Figura 5 – Esquemática do experimento de resistência de bifidobactérias à lisozima.

#### 4.9 Quantificação de Lisozima no Leite Humano Ordenhado *in natura* e Pasteurizado (LTLT)

Trinta amostras de leite humano, em diferentes estágios de lactação, foram obtidas do banco de leite humano do Instituto Fernandez Figueira (Rio de Janeiro, RJ) e duas amostras entre três e quatro meses de lactação, doadora D1 e D2 (Três Rios e Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ), foram congeladas em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a ordenha. O transporte até o laboratório foi realizado em caixas isotérmicas contendo gelo, onde foi mantido estocado em freezer na mesma temperatura até o momento do uso. O descongelamento foi realizado em refrigerador por um período de 9 horas (ALMEIDA et al., 2005). Alíquotas de 2,0 mL foram transferidas, assepticamente, para dois tubos estéreis, sendo um deles submetido à pasteurização lenta a  $62,5^{\circ}\text{C}/30$  minutos conforme o item 4.6.

A atividade de lisozima foi determinada pelo método lisoplate como descrito por Osserman e Lawlor (1966) usando como microrganismo indicador *Micrococcus luteus* (ATCC 4698; INCQS 356). A cultura foi ativada por três transferências sucessivas em caldo BHI (Himedia) e incubada a  $36^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. O crescimento da última ativação foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e o pellet lavado duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente, a massa celular foi ressuspensa em volume suficiente do mesmo tampão de forma a obter *ca*  $10^7$  UFC/mL.

Paralelamente, preparou-se frascos Erleynmeyer contendo 300 mL de Agar BHI (Vetec) que após a autoclavação ( $121^{\circ}\text{C}/15$  minutos) foram mantidos em banho termostático a  $55^{\circ}\text{C}$ . Inoculou-se 3 mL do inóculo previamente preparado de forma a obter concentração final de *ca*  $10^5$  UFC/mL. Verteu-se o conteúdo dos frascos Erleynmeyer em placas de Petri. Após solidificação e com auxílio de um furador de 6,8 mm estéril, confeccionou 5 poços em cada placa.

Transferiu-se para estes poços alíquotas de 0,1 mL de leite humano ordenhado *in natura* e pasteurizado (LTLT). As placas foram incubadas a  $36^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Os halos de inibição formados foram medidos como a distância da extremidade do poço para a extremidade do crescimento, com auxílio de um paquímetro.

A concentração de lisozima no leite humano *in natura* e pasteurizado foi conseguida através da relação entre os halos formados pelas amostras e pelas concentrações conhecidas de solução de lisozima de 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para quantificação de lisozima das amostras de leite obteve-se uma equação de 1º grau através da regressão linear obtida com as concentrações conhecidas de lisozima.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste de ANOVA a 95% de confiabilidade (XLstat, versão 7.5).

Na Figura 6 está apresentado o esquema do experimento da quantificação de lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado.

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LISOZIMA NO LEITE HUMANO ORDENHADO CRU E PASTEURIZADO

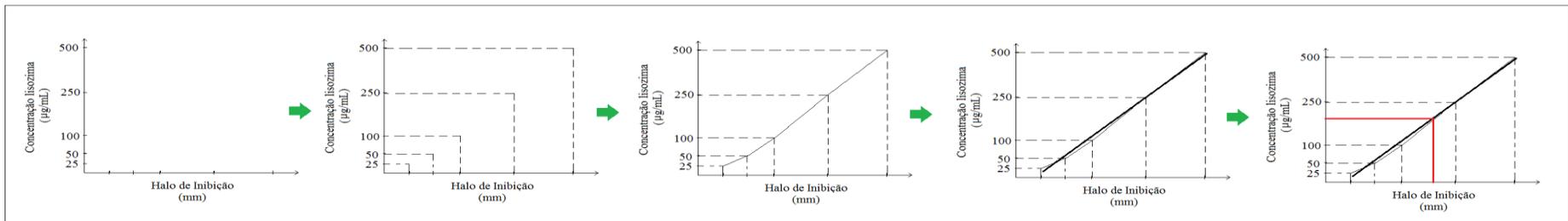
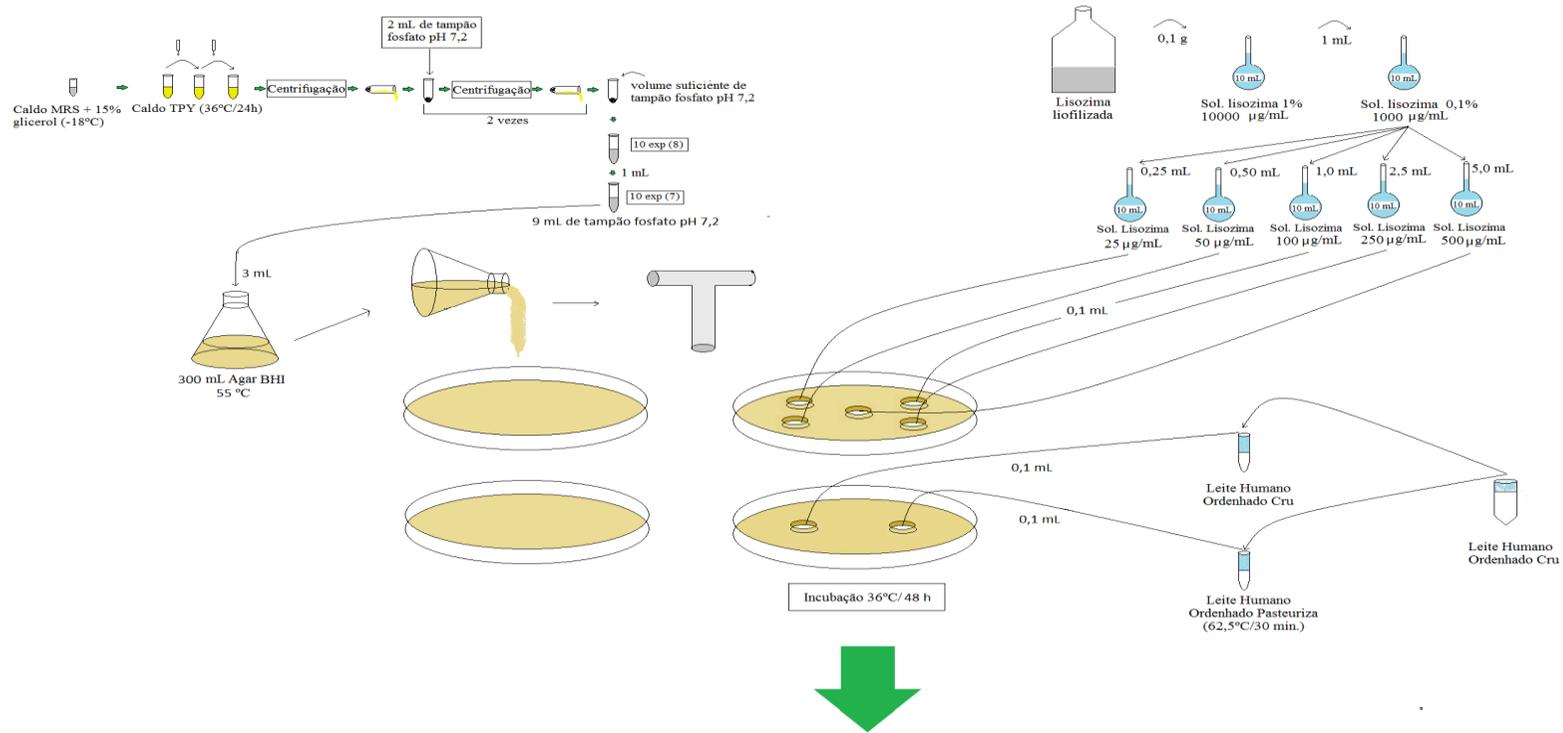


Figura 6 – Esquematização do experimento da quantificação de lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado.

#### 4.10 Análises Térmicas

Alíquotas de 20 mL de LHO foram transferidas, assepticamente, para dois tubos estéreis, sendo um deles submetido à pasteurização lenta a 62,5°C/30 minutos como descrito no item 4.6. O volume de cada um dos dois tubos foi distribuído em tubos Eppendorff estéreis para obtenção de leite desnatado por centrifugação a 21.000g em uma centrífuga refrigerada (2K15, Sigma Laborzentrifugen, Germany). Com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, retirou-se a fase aquosa correspondente ao leite cru e ao leite pasteurizado que novamente foi reunida em dois tubos estéreis (LDC e LDP). O conteúdo dos dois tubos foi esterilizado por filtração através de membranas de 0,22 µm, e quantitativamente distribuído em tubos Eppendorff da seguinte forma:

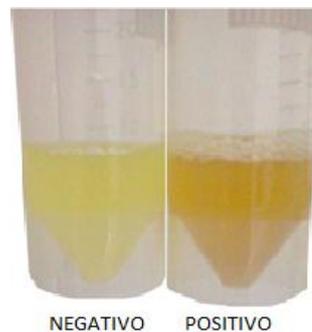
- LDC 5 mL de Leite Desnatado Cru;
- LDP 5 mL de Leite Desnatado Pasteurizado;
- LDC-G 4,85 mL de Leite Desnatado Cru adicionada em tubos estéreis contendo gordura pasteurizada;
- LDP-G 4,85 mL de Leite Desnatado Pasteurizado adicionado em tubos estéreis contendo gordura pasteurizada.

As amostras foram precedidas de liofilização, obtendo cerca de 1 g da amostra de leite seco. As amostras de leite liofilizadas foram submetidas a análises de termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG), termogravimetria diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um analisador térmico (SDT 2960, TA Instruments), sob atmosfera de nitrogênio, com massa da amostra de aproximadamente 5 mg, razão de aquecimento de 10°C/min, aquecidas de 25 até 600°C e com fluxo de nitrogênio de 120 mL/minutos. Nestas mesmas condições, foram analisados padrões de lactoferrina e lisozima (Sigma Aldrich) para comparação e interpretação das curvas obtidas para as amostras.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de Bifidobactérias à Nível de Gênero

Vinte cinco de 27 culturas presuntivas de bifidobactérias mostraram-se positivas quanto à presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase (Figura 7). Morfologicamente apresentaram-se como bastonetes Gram positivos, não esporogêneos curtos, irregulares agrupados em paliçada, em forma de V, Y alguns em forma gaivota. Também apresentaram reação negativa ao teste da catalase. Na Figura 7 está mostrado o teste de identificação da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase de isolado de bifidobactéria de origem humana juntamente com o padrão negativo de *Lactobacillus casei*.



**Figura 7**– Resultado positivo e negativo para o teste da presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase, exclusiva de bifidobacterias.

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* são heterofermentativas, mas não produzem CO<sub>2</sub>. A partir de 2 moles de hexose formam-se 3 moles de ácido acético, 2 moles de ácido lático e 5 moles de ATP. A enzima responsável por esse metabolismo é a frutose-6-fosfato fosfoacetolase que também é utilizada como marcador taxonômico para identificação destas bactérias à nível de gênero, sendo também conhecida como via bífida. (BIAVATI et al., 1992).

Excedendo *Bifidobacterium gallicum* que não fermenta lactose, todas as espécies fermentam glicose, frutose, lactose e galactose (BIAVATI, 1992). Nesta pesquisa, as 25 culturas que apresentaram positividade quanto à presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase, foram capazes de fermentar estes carboidratos. As duas bifidobactérias que não apresentaram produção desta enzima, também não fermentaram a lactose.

Determinados gêneros de bactérias como *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* e *Propionibacterium*, podem mostrar as mesmas características do gênero *Bifidobacterium*, porém não apresentam a enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase. (MODLER, 1990).

Mazo (2009) pesquisou esta enzima em 72 culturas de bacilos Gram positivos e catalase negativos. Para rompimento da membrana celular foi utilizado uma solução de detergente de brometo de cetrídio (CTAB) a 450 µg/mL por 5 minutos. Dos 72 bacilos isolados, apenas 30 foram positivos para a enzima.

Vlková et al. (2002) compararam quatro métodos de identificação de bifidobactérias à nível de gênero pela produção da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase: o método padrão descrito por Scardovi (1986), teste modificado pela adição de Triton X-100 (F6KPP-X100), teste padrão modificado pela adição de brometo de cetrídio (F6KPP-CTAB) e por PCR utilizando primers específicos (F6KPP-PCR). O método F6KPP-CTAB foi melhor em 67% das linhagens identificadas e ainda requereu menos tempo sem necessidade de utilização do sonicador (F6KPP-X-100) ou

do termociclador e aparelho de eletroforese (F6KPP-PCR). Nesta pesquisa, tentou-se romper as células com este detergente, porém apenas foi possível identificar a presença da frutose-6-fosfato fosfoetolase quando foi utilizado um disruptor celular ultrassônico para romper a membrana celular.

Na capacidade de fermentação de diferentes carboidratos, todas as culturas positivas quanto à presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoetolase, fermentaram a lactose, manose, celobiose, salicina, sorbitol, manitol, trealose, galactose, frutose, glicose e ramnose. A lactulose foi fermentada por 64% das culturas, a sacarose por 28%, a maltose por 8% e nenhuma das culturas fermentou a arabinose, xilose, amido, rafinose e esculina. Considerando que todas bifidobactérias isoladas foram negativas quanto à fermentação da rafinose, conclui-se que meios para isolamento de bifidobactérias como Agar RB (Raffinose *Bifidobacterium* Agar) é inadequado e explica a baixa percentagem de isolados comprovados como *Bifidobacterium* no trabalho desenvolvido por Mazo (2009).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da capacidade de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias.

**Tabela 1:** Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos por bifidobactérias isoladas do intestino de lactentes de até 15 dias de vida.

Bifidobactéria	LACTOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	CELOBIOSE	SALICINA	SORBITOL	MANITOL	AMIDO	TREALOSE	RAFINOSE	LACTULOSE	GALACTOSE	MALTOSE	FRUTOSE	SACAROSE	GLICOSE	SORBOSE	ESCULINA	RAMNOSE
cod. 1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 2	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 3	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 5	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
cod. 6	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
cod. 8	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
cod. 9	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 10	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
cod. 11	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. 12	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. 13	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. 14	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. 16	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
cod. 17	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 19	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. 20	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
cod. D	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. 1G	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. M7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. B1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. Bif	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. L711	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
cod. L7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
cod. J7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
cod. G1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Lactis</i> (Sacco)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Lactis</i> (C. Hansen)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

A diferenciação entre algumas espécies de bifidobactérias de origem humana pode ser feita pela capacidade de fermentação de alguns carboidratos. Entretanto há grande dificuldade em diferenciar algumas espécies, havendo necessidade de utilização de um grande número de carboidratos. A diferenciação entre *Bifidobacterium pseudocatenulatum* de *Bifidobacterium breve* ou *adolescentis*, pode ser feita pela utilização de  $\alpha$ -L-fucose, pois somente a espécie *pseudocatenulatum* foi capaz de ser 50% positiva quanto a fermentação deste carboidrato, enquanto que entre *Bifidobacterium longum* e *infantis* através da fermentação da arabinogalactana e entre as espécies *pseudocatenulatum* e *catenulatum*, a amilopectina pode ser a chave para a diferenciação (CROCIANI et al., 1994). Estes carboidratos não foram testados nesta pesquisa.

A partir do perfil de fermentação dos carboidratos estudados foi calculada uma percentagem de classificação dos isolados de *Bifidobacterium* à nível de espécie em comparação a classificação de Biavati e Mattarelli (2006). Todos os isolados foram presuntivamente classificados como sendo da espécie *breve* com percentagens de resultados similares que variaram entre 73,3 e 80%, sendo menores que 60% para as outras espécies. Porém estes resultados não são suficientes para identificação dos isolados à nível de espécie, sendo necessário a realização de outros testes.

## **5.2 Efeito da Pasteurização sobre o Potencial Prebiótico do Leite Humano Ordenhado (LHO)**

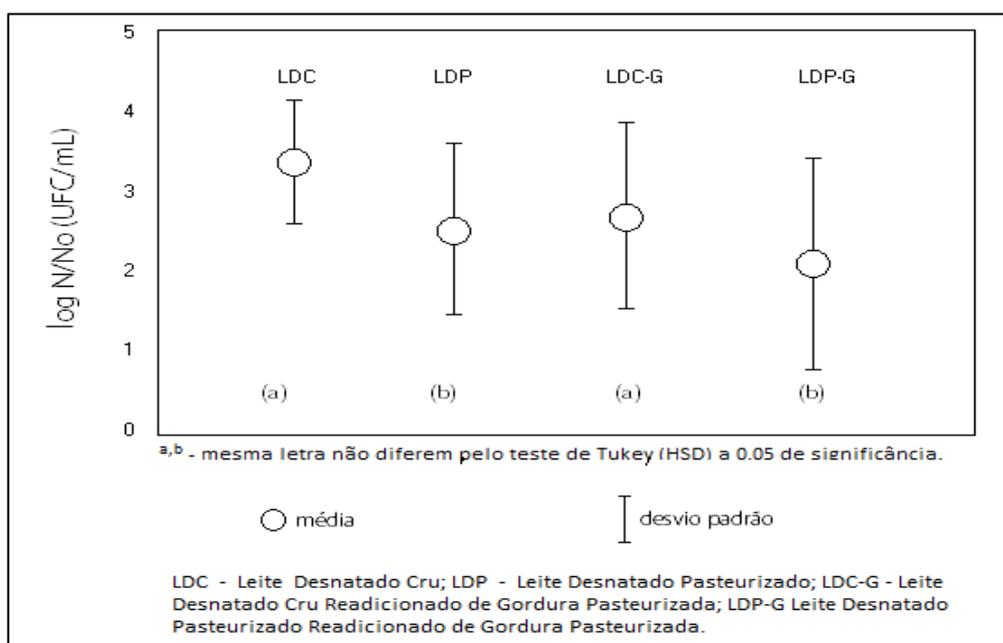
O processo conhecido como pasteurização lenta é utilizado nos bancos de leite humano para eliminar os microrganismos patogênicos e reduzir a microbiota acompanhante a um nível aceitável, e desta maneira, possibilitando armazenar o leite para disponibilizá-lo aos recém-nascidos.

A média das contagens das 27 culturas de bifidobactérias no leite humano ordenhado desnatado cru (LDC) e readicionado de gordura (LDC-G) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que nos respectivos leites pasteurizados de ambas doadoras estudadas (Figuras 8 e 9). Portanto a reconstituição com a fração gordurosa dos leites desnatado cru ou pasteurizado não contribuiu significativamente para o crescimento das bifidobactérias, sugerindo que as substâncias bioativas não estão nesta fração do leite.

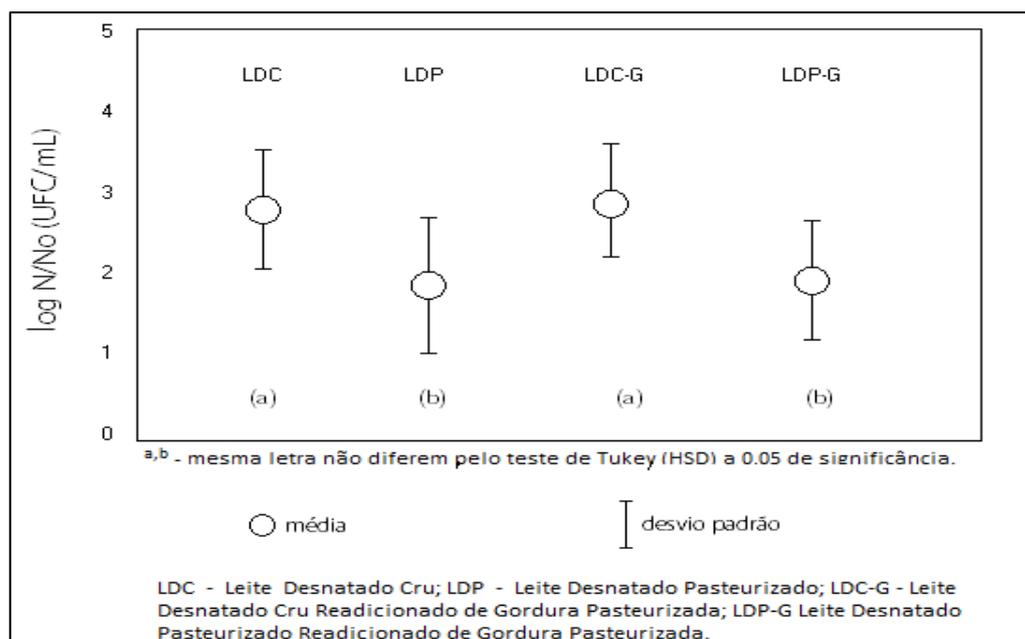
Este estímulo também foi observado por Borba (2001) ao estudar o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 e *Bifidobacterium breve* AJ 32 no leite humano pasteurizado adicionado ao filtrado do leite humano não pasteurizado; leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado; leite humano pasteurizado adicionado do leite humano pasteurizado desnatado e leite humano integral pasteurizado. Borba trabalhou com um pool de leite humano de 5 doadoras em período de lactação de 10 a 30 dias.

Comparando o crescimento de bifidobactérias nos leites desnatados cru das duas doadoras, observa-se que o crescimento no leite da doadora D1 foi superior ao leite da doadora D2. No primeiro caso, a média das contagens foram superiores a 3 logaritmos de crescimento, já no segundo, este valor não foi alcançado. Estes resultados pressupõem que a quantidade de componentes bioativos é variável de lactante para lactante já que os leites eram de períodos equivalentes de lactação. Por este motivo, nos experimentos desta pesquisa, optou-se por quantificar o potencial bifidogênicos dos leites das doadoras D1 e D2 separadamente.

O maior desvio padrão da contagem das bifidobactérias no leite da doadora D1 ocorreu na amostra LDP-G (Figura 8), enquanto no leite da doadora D2, ocorreu no LDP (Figura 9). Ou seja, quando o leite humano ordenhado sofre o processo de pasteurização, há destruição de alguns componentes bifidogênicos e algumas bifidobactérias são mais sensíveis que as outras na falta destes componentes. Nota-se menores desvios padrões no leite desnatado cru, sugerindo maior estabilidade na composição destes leites e, portanto maior uniformidade no crescimento de diferentes bifidobactérias.



**Figura 8-** Comparação do efeito bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Cru e Pasteurizado (Desnatados e Desnatados Readicionados de Gordura Pasteurizada) da doadora D1.



**Figura 9-** Comparação do efeito bifidogênico do Leite Humano Ordenhado Cru e Pasteurizado (Desnatados e Desnatados Readicionados de Gordura Pasteurizada); doadora D2.

A qualidade nutricional do leite humano pode ser influenciada pela dieta e nutrição da lactante. Lactantes desnutridas normalmente produzem leite com valores de proteínas, gordura, cálcio e vitaminas solúveis em água inferiores ao leite de lactentes bem nutridas (WHO, 1985).

VIEIRA et al. (2011) estudou o efeito de vários processos (pasteurização lenta, congelamento, descongelamento rápido e lento e distribuição pelo método sonda por gravidade e infusão contínua) no conteúdo de gordura, proteínas e lactose do leite humano. Observou-se que houve redução significativa nos conteúdos de gordura e proteína após pasteurização de 5,5 e 3,9%, respectivamente, enquanto que a velocidade do descongelamento não causou variação destes macronutrientes. O método de distribuição também influenciou o conteúdo de lipídios, no método por infusão contínua houve redução significativa. Lepri (1997) observou que a estocagem até 70 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$  não reduziu significativamente o conteúdo de gordura, mas quando estocado por 90 dias, esta redução foi aproximadamente 6%.

A maior causa da redução dos componentes bifidogênicos do leite humano processado nos bancos de leite humano está associado ao tratamento térmico, já que a maioria dos componentes bioativos do leite humano são termolábeis. Conforme observado, os componentes bifidogênicos do leite humano não estão solubilizados na gordura (Figuras 8 e 9), portanto a perda de gordura devido ao processamento do leite humano ordenhado nos bancos de leite humano, não deve afetar o efeito que este possui sobre as bifidobactérias.

Resultados semelhantes aos observados *in vitro* nesta pesquisa foram relatados por Oliveira (2011) que estudou a influência do tipo de aleitamento em 68 neonatos com idade entre 7 e 21 dias na composição e evolução da microbiota intestinal de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* Foi observado *in vivo* que o número de bifidobactérias e de lactobacilos na microbiota intestinal de lactentes foi significativamente inferior naquelas que receberam leite humano ordenhado e pasteurizado. Tanto lactobacilos como bifidobactérias são beneficiados em ambientes com baixo potencial de redox e a presença de compostos anti-oxidantes no leite humano é importante neste sentido. Anti-oxidantes como lactoferrina,  $\alpha$  tocoferol,  $\beta$  caroteno, cisteína, ácido ascórbico, ácido úrico, catalase e glutathione peroxidase estão presentes no leite humano (NETO, 2006). A maioria destes compostos são termolábeis e podem ter sido destruídos durante o processo de pasteurização do leite.

Wills et al. (1982) estudaram outros binômios de tempo e temperatura para pasteurização do leite humano e comparou os resultados com a pasteurização lenta clássica ( $62,5^{\circ}\text{C}/30$  minutos). Os ensaios realizados foram a  $62,5^{\circ}\text{C}/5$  minutos e  $56^{\circ}\text{C}/15$  minutos. O primeiro tratamento foi suficiente para eliminar completamente uma população inicial de  $10^8$  células por mL de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e o grupo *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico. O segundo tratamento garantiu o inativação acima de 99% destes mesmos grupos. As percentagens médias das proteínas antimicrobianas após os tratamentos a  $62,5^{\circ}\text{C}/30$  minutos, a  $62,5^{\circ}\text{C}/5$  minutos e a  $56^{\circ}\text{C}/15$  minutos foram: imunoglobulina A 67, 77 e 90%; lactoferrina 27, 59 e 91%; lisozima 67, 96 e 106%, respectivamente.

Bjorkstén (1980) recomendou que é desnecessário a pasteurização do leite desde que este seja ministrado ao decorrer de 72 horas, devido aos danos causados aos componentes bioativos e antimicrobianos pelo calor.

### 5.3 Análise Térmica do Leite Humano Ordenhado (LHO) Cru e Pasteurizado

Nas Figuras 10A, 10B, 10C e 10D estão mostradas as análises de termogravimetria, termogravimetria derivada, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial das amostras LDC, LDP, LDC-G e LDP-G da doadora D1. Ocorreram quatro estágios de decomposição e os resíduos foram, aproximadamente, de 30% e 20% para as amostras desnatadas e readicionadas de gordura, respectivamente (Figuras 10A e 10B). O primeiro estágio de decomposição ocorreu entre 100 e 150°C (Figura 10B), sendo de natureza endotérmica (Figura 10C e 10D), possivelmente decorrente da evaporação da água ainda presente na amostra e desnaturação de algumas frações proteicas mais termolábeis como, por exemplo, a lactoferrina (Figuras 10A, 10B, 10C e 10D). O segundo evento ocorreu entre 180 e 240°C (Figura 10B), também de natureza endotérmica (Figura 10C e 10D), possivelmente decorrente da degradação das proteínas. Há um evento discreto, de natureza exotérmica, que ocorre entre as temperaturas de 250 e 280°C. O quarto evento ocorreu entre 320 e 410°C (Figura 10B), de natureza exotérmica (Figura 10C e 10D), possivelmente decorrente da oxidação lipídica.

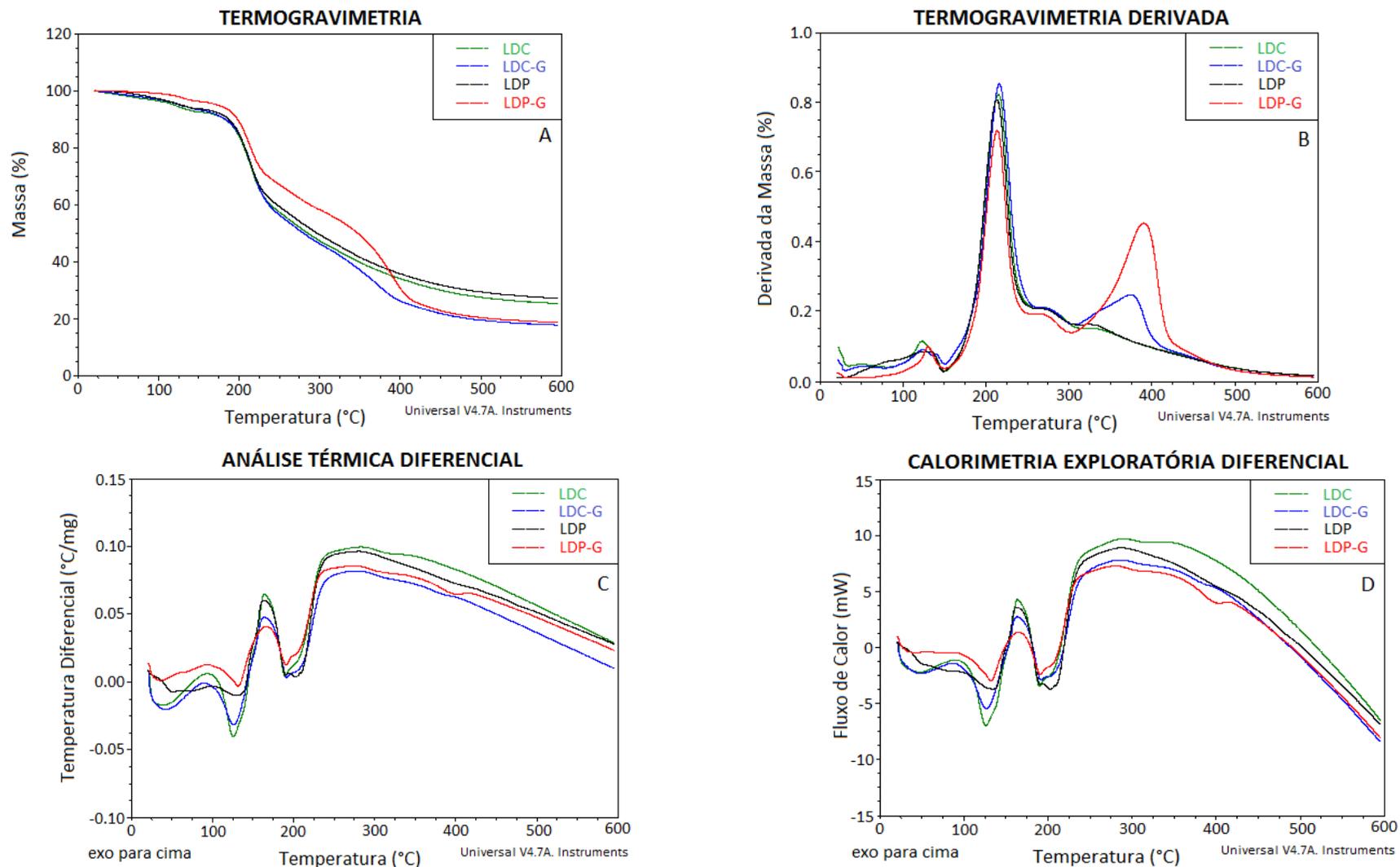
Resultados similares foram relatados por Raemy et al. (1983) que estudaram o comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial de fórmulas de leite infantil e relatou que a oxidação dos lipídios ocorreu entre 150 e 250°C, sendo o evento de natureza exotérmica. No entanto, diferentemente do encontrado nesta pesquisa com LHO, Raemy e colaboradores verificaram em fórmulas de leite, ainda, um evento exotérmico em torno de 110 – 130°C e outro da mesma natureza em torno de 130 – 150°C. Estes eventos foram atribuídos a cristalização da lactose amorfa e a reação de Maillard entre a proteína e a lactose. Vale ressaltar que estes autores utilizaram em sua pesquisa um cadinho fechado que previne eventos endotérmicos, como a decomposição da água.

Os menores teores proteicos foram encontrados no leite desnatado e pasteurizado (LDC) e no leite desnatado pasteurizado readicionado de gordura pasteurizada (LDC-G) (Figura 10B), pressupondo degradação deste componente devido ao processo de pasteurização do leite. Sabe-se que muitos componentes bioativos do leite humano são de natureza proteica e também termolábeis. As amostras desnatadas (LDC e LDP) não apresentaram o quarto estágio de decomposição, pois o desnate retirou este componente do leite humano, já nas amostras readicionadas de gordura pasteurizada o LDP-G mostrou maior pico de decomposição comparado ao LDC-G (Figura 10B). Este evento está associado à dificuldade de manipulação ao readicionar gordura ao leite desnatado.

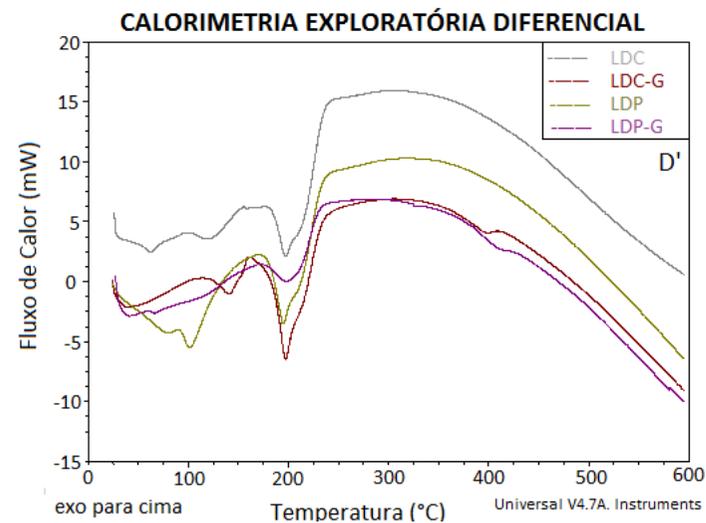
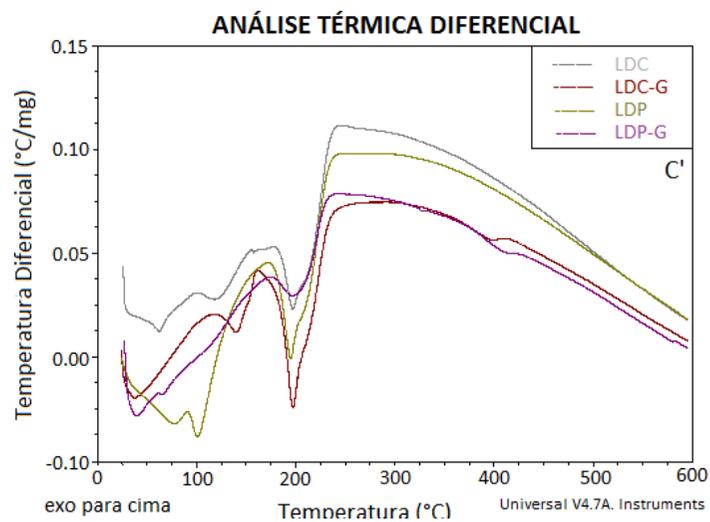
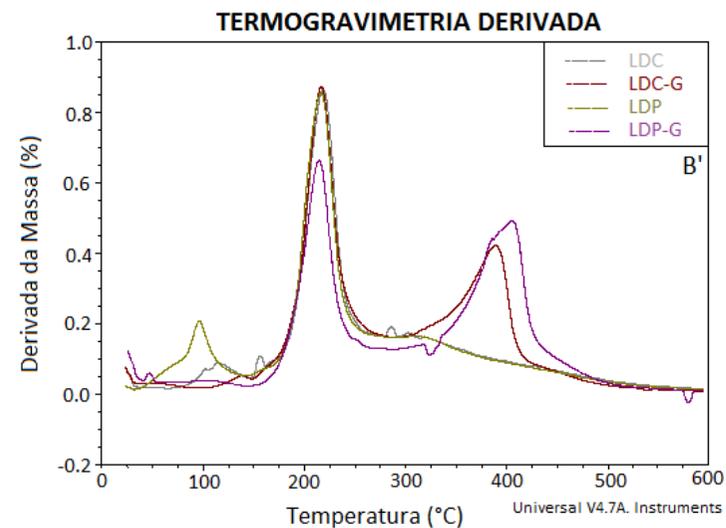
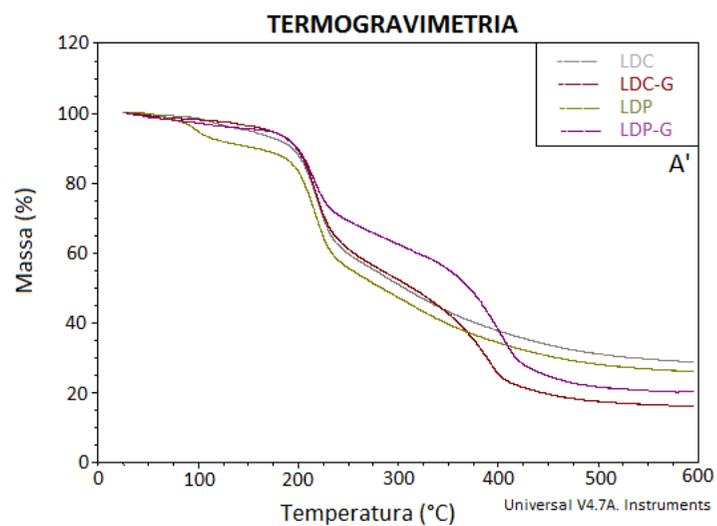
Nas Figuras 11A, 11B, 11C e 11D estão mostradas as análises de termogravimetria, termogravimetria derivada, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial das amostras LDC, LDP, LDC-G e LDP-G da doadora D2. Ocorreram três estágios de decomposição e os resíduos foram, aproximadamente, 30% e 20% para as amostras desnatadas e readicionadas de gordura, respectivamente (Figuras 11A e 11B). O primeiro estágio de decomposição ocorreu entre 50 e 150°C (Figura 11B), sendo de natureza endotérmica (Figuras 11C e 11D), possivelmente decorrente da evaporação da água ainda presente na amostra e desnaturação de algumas frações proteicas mais termolábeis (Figuras 11A, 11B, 11C, 11D). Não foi observada a presença deste estágio de decomposição para as amostras readicionadas de gordura (Figura 11B). O segundo evento ocorreu entre 175 e 235°C (Figura 11B), também de natureza endotérmica (Figuras 11C e 11D), possivelmente decorrente da degradação das

proteínas. O terceiro estágio de decomposição ocorreu entre 350 e 425°C (Figura 11B), de natureza exotérmica (Figura 11C e 11D), possivelmente decorrente da oxidação lipídica.

As amostras LDC, LDP e LDC-G da doadora D2 (Figura 11B), praticamente apresentaram o mesmo teor proteico, porém na amostra LDP-G, houve uma redução deste componente que também era esperado que ocorresse na amostra LDP. As amostras desnatadas não apresentaram este terceiro estágio de decomposição, pois o desnate retirou este componente do leite humano, já nas amostras readicionadas de gordura pasteurizada o LDC-G mostrou maior pico de decomposição comparado ao LDP-G (Figura 11B), este evento está associado à dificuldade de manipulação ao readicionar gordura ao leite desnatado.



**Figura 10** – Termogravimetria (A), termogravimetria derivada (B), análise térmica diferencial (C) e calorimetria exploratória diferencial (D) do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado readicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D1.



**Figura 11** – Termogravimetria (A'), termogravimetria derivada (B'), análise térmica diferencial (C') e calorimetria exploratória diferencial (D') do leite desnatado cru (LDC), leite desnatado pasteurizado (LDP) e do leite desnatado cru e pasteurizado readicionados de gordura pasteurizada (LDC-G e LDP-G) da doadora D2.

#### 5.4 Análise Térmica dos Padrões de Lisozima e Lactoferrina

Há dois estágios de decomposição que podem ser observados nas curvas de termogravimetria e termogravimetria derivada na amostra padrão de lisozima (Figura 12A), ambos de natureza endotérmica. O primeiro estágio ocorre de forma discreta entre 45 e 100°C, o segundo inicia a 195 °C e estende até, aproximadamente, 550°C.

Nas curvas de termogravimetria e termogravimetria derivada do padrão de lactoferrina (Figura 12B), também há dois estágios de decomposição que ocorrem praticamente nos mesmos intervalos de temperatura que a amostra de lisozima. Porém, o primeiro estágio ocorreu de forma mais pronunciada e há dois estágios discretos que ocorreram inseridos no segundo estágio. O primeiro estágio de decomposição que ocorreu nas amostras de lisozima e lactoferrina, possivelmente é proveniente da desnaturação proteica e o segundo estágio, possivelmente é proveniente da decomposição destas moléculas.

Com relação a lactoferrina, o pico máximo de degradação ocorreu em temperaturas abaixo de 100°C. Este perfil de comportamento térmico também foi descrito por Mata et al. (1998), que avaliaram a estabilidade térmica da lactoferrina por calorimetria exploratória diferencial, e verificaram que o pico máximo da degradação ocorreu a 67°C, a entalpia de transição e a energia de ativação foi de 2276 kJ/mol e 275,5 KJ/mol, respectivamente. Quando a lactoferrina foi totalmente saturada com ferro, houve aumento significativo no pico máximo de decomposição, na entalpia de transição e na energia de ativação: 90,6°C, 3209 KJ/mol e 387,6 KJ/mol, respectivamente. De maneira similar, Conesa, et al. (2008) isolaram e purificaram lactoferrina do leite humano, ovelha, cabra, camelo e elefante. As formas nativas e saturadas com ferro de lactoferrina humana e de elefante apresentaram apenas um pico de desnaturação. A lactoferrina de camelo na forma nativa, também apresentou apenas um pico, quando a amostra foi saturada com ferro, apareceram dois picos coincidentes. A lactoferrina de ovelha e cabra, tanto a forma *in natura* quanto a saturada com ferro apresentaram dois picos. A desnaturação da lactoferrina humana ocorreu entre 62 – 80°C, sendo o evento de natureza endotérmica. Quando a lactoferrina foi totalmente saturada com ferro, houve incremento na temperatura para 88 – 100°C e o perfil da curva apresentou-se mais afinado. Verificou-se, ainda, que a lactoferrina proveniente do leite humano é mais estável termicamente que a lactoferrina do leite de ovelha, cabra, camelo e elefante.

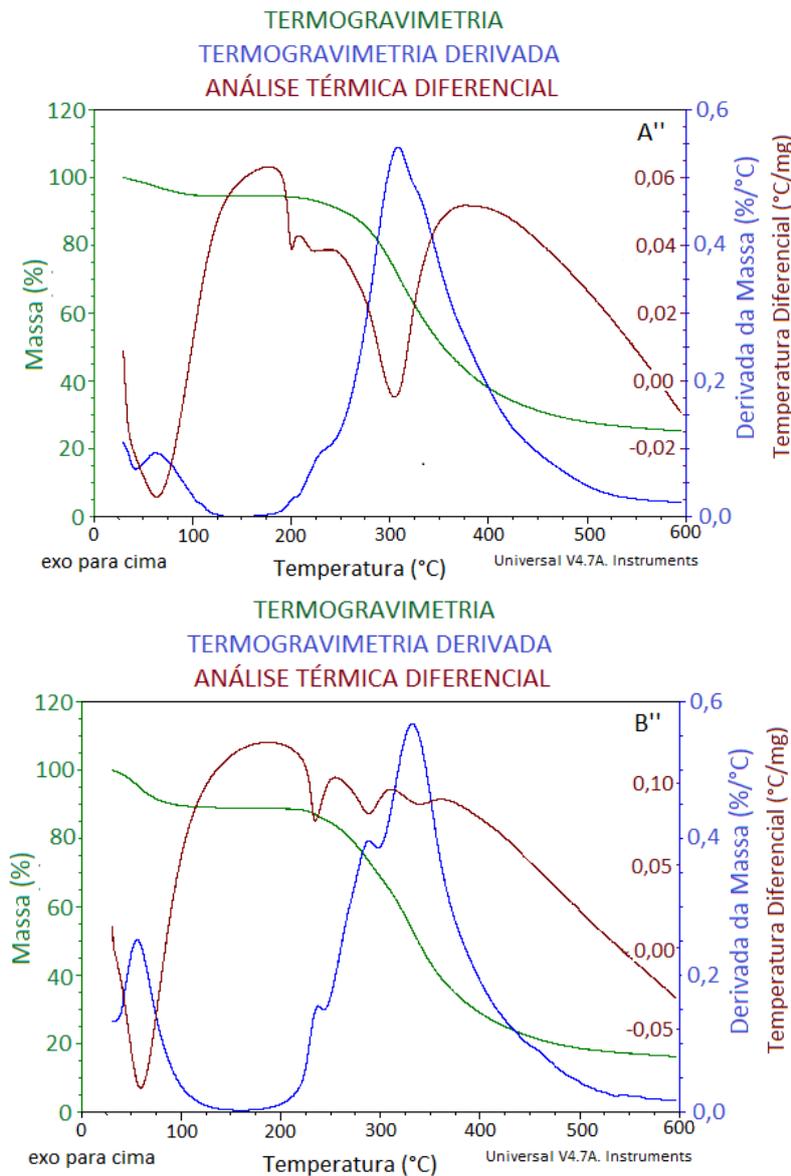
Mesmo quando a lisozima está desnaturada, há evidências que a sua ação antimicrobiana persiste. Pellegrini et al. (1997) encontraram atividade antimicrobiana na lisozima proveniente de ovo de galinha mesmo estando desnaturada, este mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas pressupõe que não seja devido a ação da lisozima à parede bacteriana.

Pellegrini et al. (1992) estudaram as propriedades inibitórias da lisozima do ovo de galinha na presença de bactérias Gram positivas e negativas e verificou que a desnaturação não causou perda nas suas propriedade bactericidas. Exames de microscopia eletrônica mostraram que a cultura de *Escherichia coli* teve o citoplasma gradualmente desintegrado, demonstrando que as propriedades bactericidas não são somente devido a atividade de muramidase, mas também devido a propriedades catiônicas e hidrofóbicas.

Drago et al. (2011) atribuíram propriedades antibacterianas a lactoferrina sobre bactérias Gram negativas, aparentemente devido a interações entre a lactoferrina e os lipopolissacarídeos presentes na membrana destas bactérias. Não se pode considerar a

lactoferrina como agente antibacteriano, mas como ela altera a permeabilidade da membrana, há penetração de substâncias com esta propriedade.

Conclui-se que a enzima lisozima não foi afetada pela pasteurização porém a lactoferrina sofreu desnaturação. Estes resultados corroboram com resultados anteriormente relatados por outros autores. Ford, et al. (1977), encontraram uma redução de 64,70% no teor de lactoferrina do leite humano quando este foi pasteurizado a 62°C por 30 minutos. Essa percentagem foi aumentada para 70,59% quando foi utilizada temperatura de 65° C por 15 minutos e para 95,77% quando utilizou 70° C por 15 minutos. Já o teor de lisozima não foi afetado pela pasteurização a 62,5 por 30 minutos, porém quando utilizou 70°C por 15 minutos houve redução de 38,09%. Pressupõe-se que a lactoferrina indisponibilize o ferro livre para utilização do crescimento microbiano.



**Figura 12** – Termogravimetria, termogravimetria derivada, análise térmica diferencial dos padrões de lisozima (A'') e lactoferrina (B'').

## 5.5 Resistência de Bifidobactérias a lisozima

Das 27 culturas de bifidobactérias testadas, apenas a linhagem comercial de *Bifidobacterium lactis* BB12 foi sensível a 400 µg/mL de lisozima de ovo de galinha (Figura 13). Este é o valor máximo de lisozima que tem sido reportado em leite humano (RADA et al. 2010, FORD et al., 1977) e também próximo do que foi encontrado nesta pesquisa (Tabela 3). A resistência a lisozima é um atributo desejável na seleção de culturas probióticas, permitindo uma vantagem competitiva, uma vez que um grande número de microrganismos, especialmente os causadores de diarreia, são sensíveis a esta enzima.

Neste estudo, todos os isolados de origem humana foram resistentes a lisozima e somente a cepa comercial de *Bifidobacterium lactis* mostrou sensibilidade a lisozima. Resultados semelhantes são reportados por outros autores. Rockova et al. (2011) pesquisaram a resistência de cinco linhagens de bifidobactérias de origem humana (*Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*) e duas de origem animal (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) na presença de 400 µg/mL de lisozima adicionadas ao crescimento exponencial após uma hora de incubação a 36°C sob anaerobiose. Dentre as bifidobactérias de origem humana, quatro foram resistentes, já as de origem animal foram suscetíveis. Quatro das bifidobactérias de origem humana também foram significativamente maiores produtores de ácido lático e acético.

Rada et al. (2010) pesquisaram a resistência de trinta e cinco bifidobactérias, dentre elas onze de origem humana, na presença de 400 µg/mL de lisozima adicionados ao crescimento exponencial. Dez foram resistentes, sendo sete de origem humana; dez foram moderadamente resistentes, sendo duas de origem humana e quinze foram suscetíveis, sendo apenas duas de origem humana.

Gagnon et al. (2003) compararam a resistência de cinco bifidobactérias isoladas de origem humana com outras quatro obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) nas concentrações de 200, 250 e 300 µg/mL. Todas as bifidobactérias isoladas de origem humana foram resistentes à concentração de 300 µg/mL, já as obtidas da American Type Culture Collection apenas duas.

A resistência a lisozima observada com todos 25 isolados humanos confirma o relatado por outros autores de que as bifidobactérias de origem humana são mais resistentes a lisozima que as de origem não humana.

A lisozima é resistente à digestão por tripsina e ao meio ácido, sendo encontrada intacta nas fezes de crianças amamentadas ao peito (BARROS et al. 1982). A digestão do leite humano não degrada a lisozima, portanto é importante as bifidobactérias serem resistentes a lisozima nas quantidades presente no leite humano para poderem permanecer viáveis e assim desempenhar função como probióticos.

A lisozima possui ação sobre a parede celular de bactérias, onde quebram as ligações glicosídicas β1-4, entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina do peptidoglicano também conhecido como mureína (JOLLÈS, 1964; GRASSI et al., 2001). A lisozima age sobre a parede celular de bactérias Gram positivas, porém também possui efeito contra bactérias Gram negativas ao interagir sinergicamente com lactoferrina e imunoglobulina A (LONNERDAL, 2003; XANTHOU, 1998). Em adição, potencializa a ação da Imunoglobulina A e do complemento, possui potencial anti-inflamatório que limita o fator quimiotático dos neutrófilos e a geração de radicais tóxicos durante a fagocitose, protegendo as células intestinais (GRASSI et al., 2001).

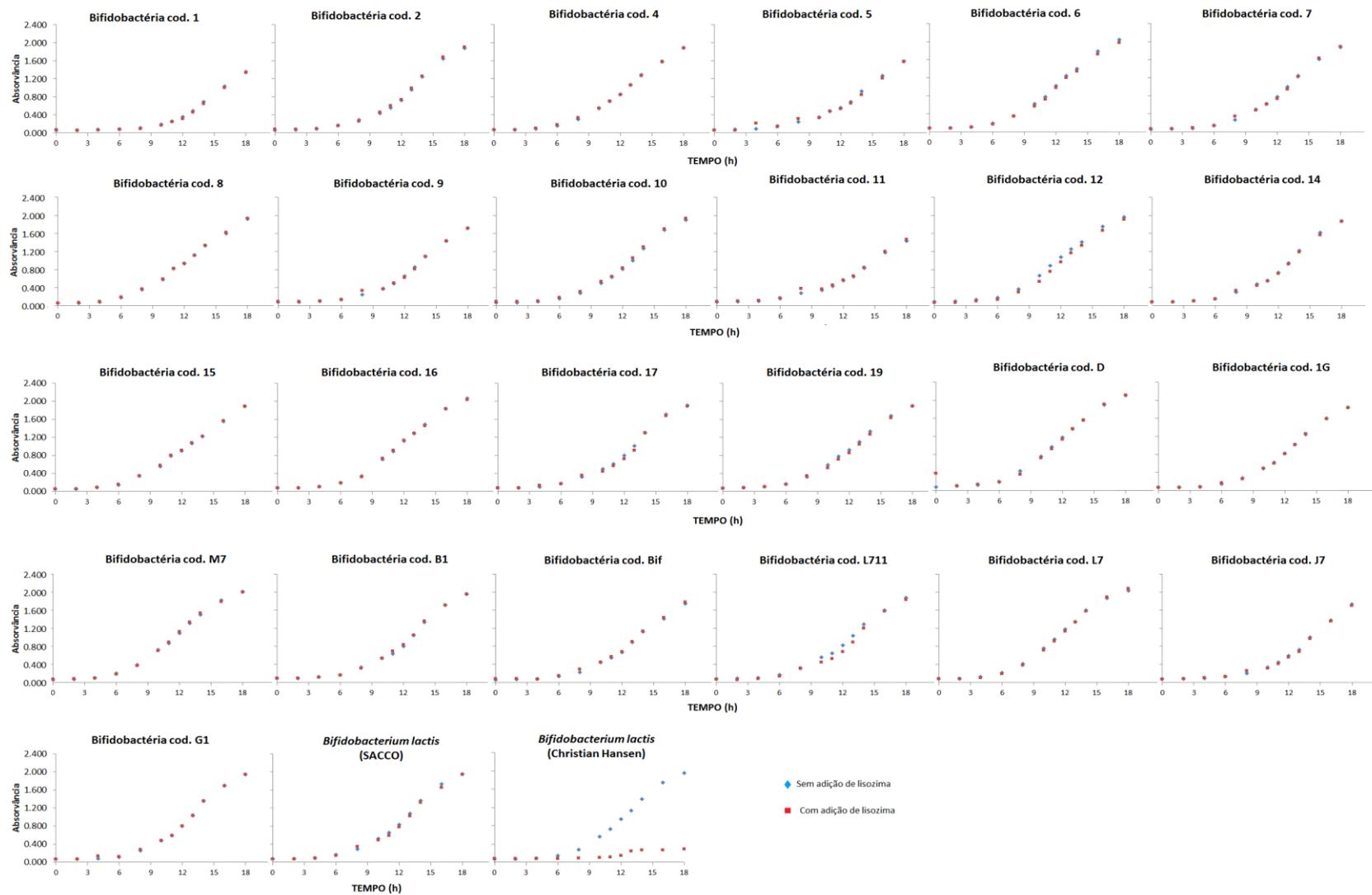


Figura 13 – Crescimento de bifidobactérias em presença e ausência de lisozima.

Algumas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, podem adquirir resistência a lisozima por serem capazes de modificar o peptidoglicano da parede celular. Modificações distintas na estrutura da parede celular modifica o peptidoglicano por O-acetilação na posição C-6 da N-acetilmuramidase, este mecanismo faz com que a célula desenvolva resistência a atividade de muramidase e modificação do ácido teicóico por esterificação da D-alanina, faz com que a célula ganhe resistência aos peptídeos antimicrobianos catiônicos (HEBERT et al., 2007; BERA et al., 2007).

## **5.6 Quantificação da Atividade da lisozima do Leite Humano Ordenhado (LHO) Cru e Pasteurizado**

A atividade de lisozima das 32 amostras de leite humano variou de 1,95 a aproximadamente 390 µg/mL (Tabela 2), com valores médios de 209,83 e 197,06 para leite cru e pasteurizado respectivamente (Tabela 3). Estes valores são mais elevados que os descritos por Quintal e Carbonare (2004), estes autores relataram concentrações de 70 µg/mL no colostro, 20 µg/mL no leite de transição e de 250 µg/mL no leite de quatro meses. Esta concentração garante uma ingestão pelo lactente de 3 a 6 mg/kg/dia, dependendo do período de lactação..

A concentração de lisozima, além de ser inerente a cada lactante, também é influenciada por fatores como período de lactação e alimentação.

Comparando os resultados das 32 amostras de leite cru e o seu correspondente pasteurizado não foi detectada diferença significativa (Tabela 3), no que é corroborado com o encontrado por Ford (1977) que não verificou alterações na atividade da enzima no tratamento de pasteurização rápida (72°C/15s) ou lenta (62,5/30min). Entretanto quando o leite foi tratado em temperaturas iguais ou superiores a 70°C por 15 minutos, houve redução significativa da atividade de lisozima.

**Tabela 2** – Quantificação da atividade da lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado (LTLT)

Código da Amostra	Leite cru			Leite Pasteurizado			Leite cru		Leite Pasteurizado		Atividade Lisozima Leite Cru (µg/mL)	Atividade Lisozima Leite Pasteurizado (µg/mL)
	Raio do halo (mm)			Raio do halo (mm)			Média (mm)	Desvio padrão	Média (mm)	Desvio padrão		
1	455	480	430	455	460	455	455	25.00	457	16.07	390.65	392.86
2	335	335	320	375	405	365	330	8.66	382	43.11	225.01	293.48
3	320	325	320	325	320	320	322	2.89	322	2.89	213.97	213.97
4	260	320	315	305	310	290	298	33.29	302	5.00	183.05	187.47
5	415	400	385	410	405	410	400	15.00	408	13.23	317.77	328.81
6	135	125	130	160	160	165	130	5.00	162	17.32	Nd (*)	1.95
7	380	345	365	335	315	315	363	17.56	322	25.17	269.18	213.97
8	355	360	335	335	320	345	350	13.23	333	8.66	251.52	229.43
9	325	390	400	345	320	320	372	40.72	328	40.93	280.23	222.80
10	390	405	375	370	390	455	390	15.00	405	10.41	304.52	324.40

(\*) Não determinado.

**Tabela 2** – Quantificação da atividade da lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado (LTLT)

Código da Amostra	Leite cru			Leite Pasteurizado			Leite cru		Leite Pasteurizado		Atividade Lisozima Leite Cru (µg/mL)	Atividade Lisozima Leite Pasteurizado (µg/mL)
	Raio do halo (mm)			Raio do halo (mm)			Média (mm)	Desvio padrão	Média (mm)	Desvio padrão		
11	400	395	395	345	350	375	397	2.89	357	16.07	313.35	260.35
12	375	345	365	340	340	345	362	15.28	342	2.89	266.97	240.47
13	350	320	325	335	340	355	332	16.07	343	10.41	227.22	242.68
14	305	315	315	305	305	305	312	5.77	305	0.00	200.72	191.89
15	370	360	355	345	365	400	362	7.64	370	27.84	266.97	278.02
16	305	315	300	220	295	295	307	7.64	270	43.30	194.09	145.51
17	300	300	325	240	265	270	308	14.43	258	16.07	196.30	130.05
18	375	360	355	380	400	395	363	10.41	392	10.41	269.18	306.73
19	300	300	305	340	330	350	302	2.89	340	10.00	187.47	238.26
20	160	165	160	200	185	180	162	2.89	188	10.41	1.95	37.29
21	345	360	355	350	350	355	353	7.64	352	2.89	255.93	253.72

(\*) Não determinado.

**Tabela 2** – Quantificação da atividade da lisozima no leite humano ordenhado cru e pasteurizado (LTLT)

Código da Amostra	Leite cru			Leite Pasteurizado			Leite cru		Leite Pasteurizado		Atividade Lisozima Leite Cru (µg/mL)	Atividade Lisozima Leite Pasteurizado (µg/mL)
	Raio do halo (mm)			Raio do halo (mm)			Média (mm)	Desvio padrão	Média (mm)	Desvio padrão		
22	355	360	320	350	380	360	345	21.79	363	15.28	244.89	269.18
23	310	290	260	260	315	315	287	25.17	297	31.75	167.59	180.84
24	395	400	385	350	365	375	393	7.64	363	12.58	308.94	269.18
25	200	225	230	190	185	165	218	16.07	180	13.23	77.04	26.25
26	355	385	350	200	210	225	363	18.93	212	12.58	269.18	68.21
27	210	225	220	200	225	235	218	7.64	220	18.03	77.04	79.25
28	230	235	280	220	230	235	248	27.54	228	7.64	116.80	90.29
29	160	155	165	165	165	165	160	5.00	165	0.00	nd	6.37
30	305	310	325	260	275	290	313	10.41	275	15.00	202.93	152.13
D1	305	310	310	260	280	300	308	2.89	280	20.00	196.30	158.76
D2	355	375	380	360	365	370	370	13.23	365	5.00	278.02	271.39

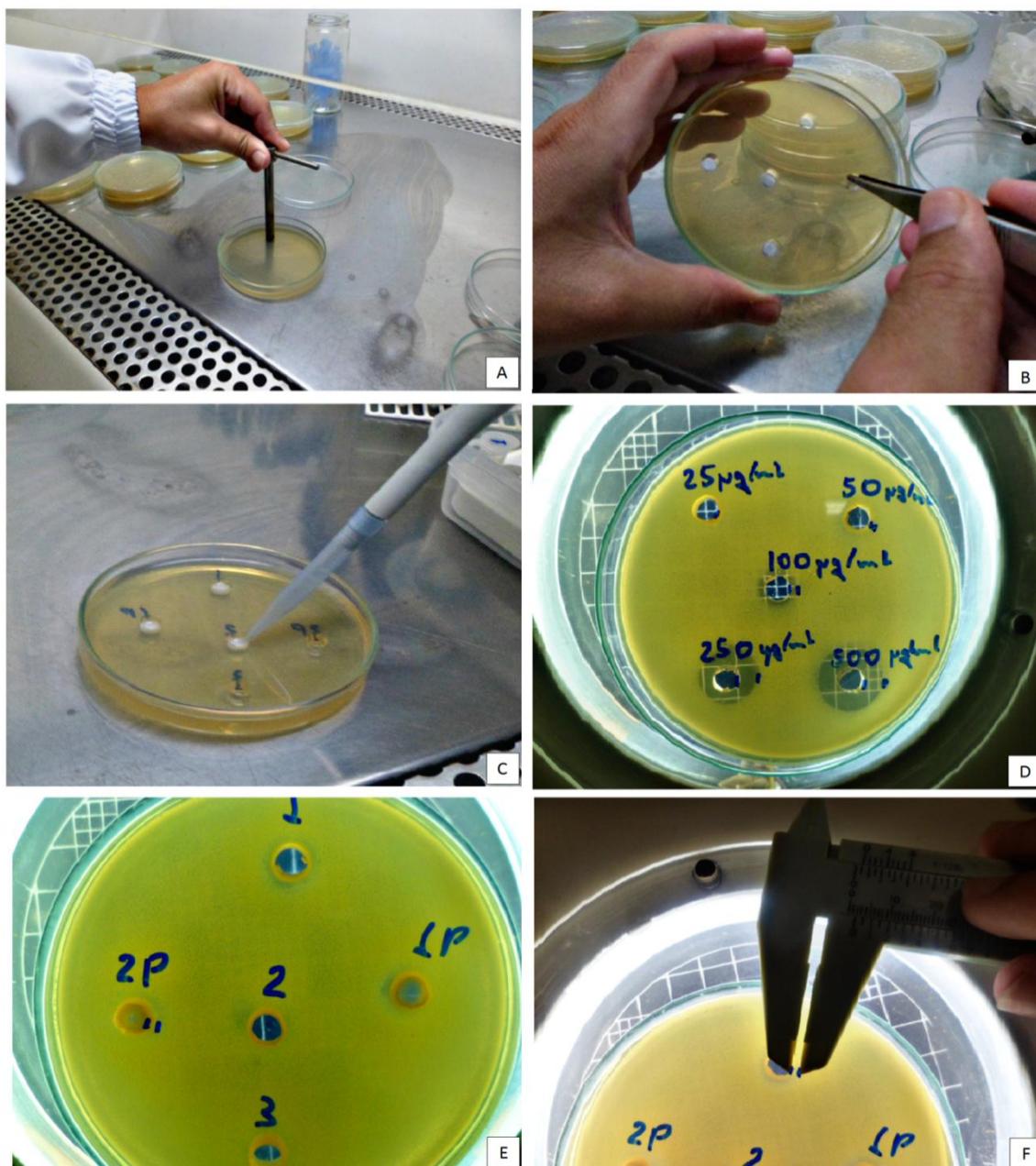
(\*) Não determinado.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão dos valores de atividade de lisozima em 32 amostras de leite humano ordenhado cru e pasteurizado.

Atividade de Lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média	Desvio padrão
Leite Cru	209,83 a	98,97
Leite Pasteurizado	197,06 a	100,47

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

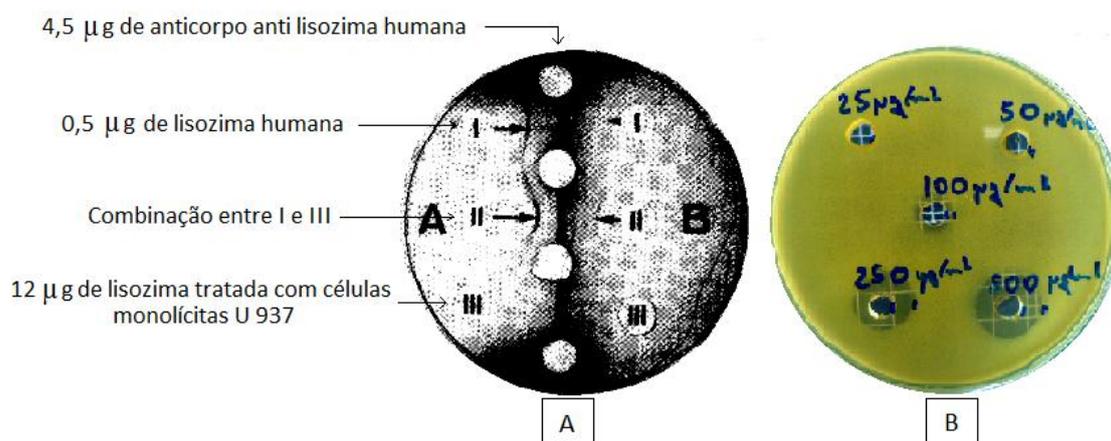
Na Figura 14 está ilustrado o procedimento para execução do experimento de quantificação de lisozima no leite humano utilizando o método lisoplate.



**Figura 14** – Confeção dos poços (A, B); enchimento dos poços com LHO (C); halos de inibição de diferentes concentrações de lisozima de ovo de galinha (D); halos de inibição do LHO cru e pasteurizado (E); medição dos halos de inibição (F)

Gupta et al. (1987) estudaram as condições reais de aplicação do método lisoplate desenvolvido por Osserman e Lawlor (1966) na quantificação da concentração da atividade da lisozima pelo método de titulação com anticorpo específico. A sensibilidade do método lisoplate é largamente dependente da qualidade da difusão do meio e das substâncias que afetam a interação com o meio sólido e a verdadeira taxa de difusão.

Neste presente experimento, o meio utilizado foi o Infusão Cérebro Coração (Himedia) com concentração de 1,5% de Agar. A taxa de difusão foi bastante inferior às encontradas no Agar bacteriológico (Nunc) e pelo Agar Noble (Difco) utilizado por Gupta et al. (1987) (Figura 15).



**Figura 15:** Comparação entre os ensaios lisoplate realizados por Gupta et al. (A) e os encontrados com os padrões de lisozima de ovo galinha deste experimento (B), ambos lise sobre *Micrococcus luteus*.

Ruas (2010) estudou a atividade da lisozima de ovo de galinha quantificando o decréscimo da turbidez de suspensões de bactérias e fungos. O microrganismo mais sensível a lisozima foi *Micrococcus luteus* ATCC 4698. Vakil, et al. (1969) estudaram a sensibilidade do *Micrococcus luteus* a lisozima proveniente do leite de vaca, do leite humano e de ovo de galinha em presença e ausência de cloreto de sódio e ácido etileno diamino tetracético (EDTA). A lisozima menos efetiva sobre a taxa de lise do *Micrococcus luteus* foi a proveniente do ovo de galinha e a mais efetiva, a do leite de vaca.

Nesta pesquisa quantificou-se a atividade de lisozima no leite humano cru e pasteurizado (62,5°C/30 minutos), usando lisozima de ovo de galinha como padrão. Portanto há um pequeno erro na expressão dos resultados, visto que a lisozima de ovo de galinha possui menor atividade de lise sobre o *Micrococcus luteus* que a lisozima humana. A concentração de lisozima no leite humano é cerca de 300 vezes superior ao leite de vaca (BARROS et al., 1982).

Goldman e Goldblum (1989) estudaram as modificações que ocorrem na concentração de alguns constituintes protetivos do leite humano de lactante para lactante. Quando a imunoglobulina A e a lactoferrina decrescem mais cedo que o normal, há incremento na concentração de lisozima. Este evento é mais evidente entre o sexto e o vigésimo quarto mês de lactação.

Goldblum et al. (1981) estudaram a perda de lisozima durante a estocagem do leite humano ordenhado por 24 horas a 4°C em frascos de vidro e polipropileno utilizando a técnica da eletroimunodifusão. A perda de lisozima durante o período de

estocagem foi de 40%, mas a composição do frasco não influenciou significativamente esta perda. As causas podem ser devido à aderência desta proteína na superfície da parede dos frascos ou outros mecanismos associados à temperatura baixa.

Duhaiman (1988) purificou e quantificou a atividade de lise da lisozima do leite de camelo usando *Micrococcus luteus* e comparou com lisozima de origem humana e de ovo de galinha. A atividade da lisozima proveniente do leite humano foi 39,7 U/mg que é cerca de 6,5 e 3,5 vezes maior que a do leite de camelo e de ovo de galinha, respectivamente. Parry et al. (1968) também isolaram e quantificaram a atividade da lisozima do leite humano através da taxa de lise de células de *Micrococcus luteus* e também verificaram que a atividade específica da lisozima de leite humano foi 3,5 maior que a lisozima de ovo de galinha. O ponto isoelétrico e a estabilidade térmica também foram superiores.

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível identificar bifidobactérias à nível de gênero através da detecção da enzima furtose-6-fosfato fosfocetolase obtenção alta percentagem de positividade.

As bifidobactérias isoladas de origem humana utilizadas nesta pesquisa foram resistentes a lizozima de ovo nas concentrações presentes no leite humano em todos os estágios de lactação.

A pasteurização lenta (LTLT) reduziu significativamente o potencial bifidogênico do leite humano ordenhado, e esta redução ocorreu nos componentes bioativos não gordurosos do leite.

As análises térmicas de termogravimetria, termogravimetria derivada, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial apontaram indícios de redução no conteúdo dos componentes bioativos presentes na fração proteica do leite.

A pasteurização lenta (LTLT) não afetou significativamente a atividade de lizozima do leite humano ordenhado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. A. G.; GUIMARÃES, V.; NOVAK, F. R. Normas técnicas para bancos de leite humano. **Fiocruz/IFF-BLH**. Rio de Janeiro, 2005.

ASAKUMA, S.; URASHIMA, T.; AKAHORI, M.; OBAYASHI, H.; NAKAMURA, T.; KIMURA, K.; WATANABE, Y. I. Arai, and Y. Sanai. Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum. **Eur. J. Clin. Nutr.** Obihiro v. 62, p.488-494, 2008.

ANDERSON, B. F.; BAKER, H. M.; DODSON, E. J.; NORRIS, G. E.; RUMBALL, S. V.; WATERS, J. M.; BAKER, E. N. Structure of human lactoferrina at 3.2-Å resolution. **Proc Natl Acad. Sci. USA**. Palmerston North, v. 84, p. 1769-1773, abr. 1987.

ANDERSON, Y.; LINDQUIST, S.; LAGERQVIST, C. HERNELL, O. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. **Early Human Development**. Umea, v. 59, p. 95-105, 2000.

BARROS, M. D.; KULESZA, T. M.; RANNA, W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Papel do Leite Humano na Defesa do Lactente Contra Infecções. **Revisões e Ensaios**. São Paulo, v. 4, p. 88 – 102, 1982.

BERA, A.; BISWAS, R.; HERBERT, S.; KULAUZOVIC, E.; WEIDENMAIER, C.; PESCHEL, A.; GOTZ, F. Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. Tubingen, v. 189, n.1, 2007.

BERGER L. R.; WEISER, R. S. The beta-glucosaminidase activity of egg-white lysozyme. **Biochim Biophys Acta**. Washington v. 26, n. 3, p. 517-521, 1957.

BEZKOROVAINY, A. Human milk and colostrum proteins: a review. **J. Dairy Sci**. Chicago, v. 60, p. 1023-1027, 1977.

BIAVATI, B.; SCORBATI, B.; SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: The Prokaryotes, ed..A. BALOWS; H.G. TRIPER; M. DOWIKAN; W. HARDER; K. SCHLEIFER. London, p. 814-829, 1992.

BIAVATI, B.; MATTARELLI, P. **The family bifidobacteriaceae. The Prokaryotes – A handbook on the biology of bacteria**. Springer, Ed. 3, 2006, 1149 p.

BODE, L. Recent advances on structure, metabolism and function of human milk oligosaccharides. **The Journal of Nutrition**. La Jolla, v. 136, p. 2127-2130, 2006.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. **Nutrition Reviews**. San Diego, v.67, n. 2, p. 183-191, 2009.

BJORKSTÉN, B; BURMAN, L. G.; CHÂTEAU, P. D.; FREDRIKZON, B.; LEIF, G.; HERNELL, O. Collecting and banking human milk: To heat or not to heat? **British Medical Journal**. Umea, v. 281, p. 765-769, 1980.

BORBA, L. M. Efeito do Processo de Pasteurização do Leite Humano no Crescimento De *Bifidobacterium* spp. "in vitro" 2011, 121p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Viçosa, Viçosa, 2001.

BULLEN, J.J.; ROGERS H. J.; LEIGH, L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. **Br Med J.** London, p. 69-75, 1972.

CANFIELD, R. E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 238, n. 8, p. 2698-2707, 1963.

CONESA, C.; SÁNCHEZ, L.; ROTA, C.; PÉREZ, M. D.; CALVO, M.; FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Isolation of lactoferrin from milk different species: calorimetric and antimicrobial studies. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Zaragoza, p. 131-139, 2008.

COPPA, G. V.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; GABRIELLI, O. Prebiotics um human milk: a review. **Digestive and Live Disease.** Ancona, 38 suppl. 2, p. 291-294, 2006.

CROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M. M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **Journal of Food Microbiology.** Bologna, v. 24, p. 199-210, 1994.

DAVIDSON, L. A.; LONNERDAL, B. Persistence of human milk in the breast-fed infant. **Acta Pedr Scand.** Davis, v. 76, p.733-740, 1987.

DEGNAN, B.A.; MACFARLANE, G.T. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters.** Cambridge, v.84, p.151-156, 1991.

DIONYSIUS, D. A.; GRIEVE, P. A.; MILNE, J. M. Forms of lactoferrina: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science.** Queensland, v. 76, n. 9, 1993.

DRAGO, S. M. E.; GARZA, A. M.; LUNA, J. S.; RODRÍGUES, R. C. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. **International Immuno pharmacology.** México, v. 12, p. 1-9, 2011.

DUBOIS, T.; GHUILLARD, R.; PRIEELS, J. B.; PERRAUDIN, J. P. Comparison between the folding of reduced hen-egg white lysozyme and the reduced human milk lysozyme. **Biochemistry.** Minneapolis, v. 21, p. 6515-6523, 1982.

DUHAIMAN, A. S. Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** Riyadh, v. 91B, v. 4, p. 793 – 796, 1988.

ENGFER, M. B.; STAHL, B.; FINKE, B. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. **Am J Clin.** Giessen, v. 71, n. 6, p. 1589-1596, 2000.

FOMON, S.J. Human milk and breast feeding. In: **Nutrition of Normal Infants**. St. Louis: Mosby, p.409-423, 1993. ISBN 1-55664-248-2.

FORD, J. E.; LAW, B. A.; MARSHALL, V. M. E.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **The Journal of Pediatrics**. United Kingdom, p, 29-35, 1977.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. 1989; 66:365-78.

GAGNON, M.; KHEADR, E. E.; LE BLAY, G.; FLISS I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*. Alexandria, v. 92, p. 69-78, 2004.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo, Ed. Nobel. 2009. ISBN 978-85-213-1382-3. 505 p.

GOLDBLUM, R. M.; GARZA, C.; JOHNSON, C. A.; HARRIST, R.; NICHOLS, B.; GOLDMAN, A. S. Human milk banking I. Effects of container upon immunologic factors in mature milk. **Nutrition Research. Houston**. Galveston, v. 1, p. 449-459, 1981.

GOLDMAN, A. S.; GOLDBLUM, R. M. Immunologic system in human milk: Characteristics and effects. In: "**Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Early Infancy**". New York. Ed. Raven Press, ed. 2, p. 135-142, 1989.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**. Porto, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOMES A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar**. Porto, p. 12-22, 1999.

GRASSI, M. S.; COSTA, M. T. Z.; VAZ, F. A. C. Fatores imunológicos do leite humano. **Revisão e Ensaio**. São Paulo, v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001.

GUPTA, D. K.; FIGURA, K. V.; HASILIK, A. Conditions for a reliable application of the lysoplate method in the determination of lysozyme. **Clinica Chimica Acta**. Cleveland, v. 165, p. 73-82, 1987.

HAINES, P. J. **Principles of Thermal Analysis And Calorimetry**. Cambridge, UK: Lynx Edicions, 1992. [ISBN 0-85404-610-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-85404-610-0)

HAMOSH, M. Handbook of Milk Composition: Enzymes in Human Milk. p. 388 – 427, 1995.

HAYASHI, T.; TAKEUCHI, T.; ITABASHI, K.; OKUYAMA, K. Nutrient balance, metabolic response, and bone growth in VLBW infants fed fortified human milk. **Early Human Development**. Tokyo, v. 39 n. 39, p. 27-37, 1994.

HENNART, P. F.; BRASSEUR, D. J.; DELOGNE-DESNOECK, J. B.; DRAMAIX, M. M.; ROBYN, C. E. Lysozyme, lactoferrina, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. **Am J Clin Nutr. Brussels**, v. 53, n. 4 p. 32-39, 1991.

HERBERT, S.; BERA, A.; NERZ, C.; KRAUS, D.; PESCHEL, A.; GOERKE, C.; MEEHL, M.; CHEUNG, A.; GOTZ, F. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in Staphylococci. **Plos Pathogens**. Tubingen, v. 3, n. 7, p.981 - 984, 2007.

JOLLÈS, P. Recent developments in the study of lysozyme. **Angewandte Chemie International Edition in English**. Paris, v.3, n. 1, p. 28-36, 1964.

JOLLÈS, J.; JAUREGUI-ADELL, J.; BERNIER, I.; JOLLÈS P. La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule: etude détaillée. **Biochimica et Biophysica Acta**. Paris, v. 78 n.4, p. 668-689, 1963.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. Lysozyme from human milk. **Nature**. Paris, v. 192, p. 1187-1188, 1961.

JOVANÍ, M.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. Effect of lactoferrina addition on the dialysability of iron from infant formulas. **J. Trace Elem. Med. Biol**. Valencia, v. 17, n. 2, p. 139 – 142, 2003.

LAURINDO, V. M.; CALIL, T.; LEONE, C. N.; RAMOS, J. L. Composição nutricional do colostro de mães de recém nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Revisões e Ensaios**. São Paulo, p. 14 – 23, 1991.

LEPRI, L.; BUBBA, M.; MAGGINI, R.; DONZELLI, G. P.; GALVAN, P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. **Journal of Chromatography**. Florença, n. 704, p. 1-10, 1997.

LOCASCIO, R. G.; NINONUEVO, M. R.; FREEMAN, S. L.; SELA, D. A.; GRIMM, R.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A.; GERMAN, J. B. Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. **J. Agric. Food Chem**. Santa Clara, v. 55, p. 8914-8919, 2007.

LAURINDO, V. M.; CALIL, T.; LEONE, C. N.; RAMOS, J. L. Composição nutricional do colostro de mães de recém nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Revisões e Ensaios**. São Paulo, p. 14 – 23, 1991.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**. David, v. 77, n.6, p. 1537 – 1543, 2003.

LUCAS, A.; LUCAS, P. J.; CHAVIN, S. I.; LYSTER, R. L. J.; BAUM, J. D. A human milk formula. **Early Human Development**. Oxford, v. 4, n. 1.P. 15-21, 1980.

KRAUSE, L. J.; FORSBERG, C. W.; O'CONNOR, D. L. Feeding human milk to rats increases Bifidobacterium in the cecum and colon which correlates which enhanced folate status. **The Journal of Nutrition**. Ontario, v. 126, n. 4, p. 1505-1511, 1996.

MAIA, P. R. S.; ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, D. A. Rede nacional de bancos de leite humano: gênese e evolução. **Rev. Bras. Matern. Infant**. Recife, v. 3, n. 6, p. 285-292, 2006.

MAHLER, J. H. **A Brief Overview of Whey and Colostrum and Their Potential as Functional Food Ingredients**. 2008. Disponível em: <http://www.chiroeco.com/chiropractic/news/4981/795/a-brief-overview-of-whey-and-colostrum-and-their-potential-as-functional-food-ingredients/>. Acesso em: 22/3/2012.

MATA, L.; SÁNCHEZ, L.; HEADON, D. R; CALVO, M. Thermal Denaturation of Human Lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. **J Agric. Food Chem**. Zaragoza, v. 46, n. 10, p. 3964-3970, 1998.

MAZO, J. Z. Isolamento, caracterização e viabilidade tecnológica de bifidobactérias de origem humana com atividade potencialmente probiótica. 2009, 129p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

METTLER TOLEDO. Thermal analysis. **Mettler Toledo Collected Applications**. Cap. 9, p. 146-170, 2011.

MILLANI, E.; KONSTANTYNER, T.; TADDEI, J. A. A. C. Efeitos da utilização de prebióticos (oligossacarídeos) na saúde da criança. Ver Paul Pediatr. São Paulo, v. 4, n. 27, p. 436-446, 2009.

MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**. Ottawa, v. 23, p. 2041, 1990.

NETO, M.T. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. **Act Pediatr Port**. Lisboa, v. 37, n. 1, p. 23-26, 2006.

NIÑONUEVO, M. R.; PERKINS, P. D.; FRANCIS, J.; LAMOTHE, L. M.; LOCASCIO, R. G.; FREEMAN, S. L. MILLS, D. A.; GERMAN, J. B.; GRIMM, R.;LEBRILLA, C. B. Daily variations in oligosaccharides of human milk determined by microfluidic chips and mass spectrometry. **J Agric Food Chem**. California, v. 56, n. 2, p. 618–626, 2008.

OLIVEIRA, G.S. Modulação da Microbiota Colônica e Sanidade de Lactentes: Fatores Prébióticos de Leite e de Virulência de microrganismos. 2011, 122p. Tese (Doutorado) – Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

OGUNDELE, M. O. Techniques for the storage of human breast milk: implications for anti-microbial functions and safety of stored milk. **Eur. J. Pediatr.** Gottingen, n. 159, n. 11, p. 793-797, 2000.

OSSERMAN, E. F.; LAWLOR, D. P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. **The Journal of Experimental Medicine.** New York, v. 124, n. 5, p. 921-955, 1966.

PARRY, R. M.; CHANDAN, R. C.; SHAHANI, K. M. Isolation and Characterization of Human Milk Lysozyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** Lincoln, v. 130, p. 59 – 65, 1969.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; FELLEBERG, R.; WILD, P. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. **Journal of Applied Microbiology.** Zurich, v. 72, n. 3, p. 180 - 187, 1992.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; KLAUSER, S.; HUNZIKER, P.; FELLEBERG, R. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. **Journal of Applied Microbiology.** Zurich, v. 82, p. 372 – 378, 1997.

PHILLIPS, D. C. On the design of single Crystal diffractometers to measure a number of reflections simultaneously. **J. Sci Instrum.** London v. 41, n.3, 1964.

QUINTAL, V. S.; CARBONARE, S. B. **Imunologia do leite humano.** Porto Alegre, Ed. Artmed/Panamericana Ltda, 2004, p. 51.

RADA, V.; SPLICHAL, I.; ROCKOVA, S.; GRMANOVA, M.; VLKOVA, E. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. **Biotechnol Lett.** Prague, v. 32, n. 3, p. 451-455, 2010.

RAEMY, A.; HURRELL, R. F.; LOLIGER, J. Thermal behavior of milk powders studied by differential thermal analysis and heat flow calorimetry. **Thermochemica Acta.** Amsterdam, v.65, n. 1, p. 81-92, 1983.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. Dados Estatísticos.

Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=352>>. Acesso em: 28/2/2012.

REITER, B. Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids with special reference to the complement/ antibody transferrin/lactoferrin and lactoperoxidase/thiocyanate hydrogen peroxide systems. Inhibition and inactivation of vegetative microbes. Proceedings of Society of Applied Bacteriology Symp Series. Ed. **Academic Press.** New York, n. 5, p. 34, 1976.

RIBEIRO, K.D.S.; MELLA, I. L. P.; PRISTO, A. Z. O.; DIMENSTEIN, R. Efeito do processamento do leite humano sobre os níveis de retinol. **J Pediatr.** Rio de Janeiro, v. 81, n.1, p. 61 – 64, 2005.

ROCKOVA, S.; NEVORAL, J.; RADA, V.; MARSIK, P.; SKLENAR, J.; HINKOVA, A.; VLKOVA, E.; MAROUNEK, M. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. **International Dairy Journal**. Prague, v. 21, n. 7, p. 504-508, 2011.

RUAS, G. W. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas. 2010, 81 p. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Área de Produção e Controle Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

SALTON, M. R. J. Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. **Nature**. Cambridge v. 170, p. 746-747, 1952.

SCARDOVI, V. In: Sneath PHA, Mair NS, sharpe me AND Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, MD: Williams and Wilkins., p.1418-1434, 1986.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, 2002. ISBN 85-7307-976-2

SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Quim. Nova**. São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1535-1538, 2007

SCHLZE, J.; ZUNFT, H. J. Lactose – a potential dietary fiber. The regulation of its microecologic effect in the intestinal tract 3. Dietary fiber actions of lactose due to microbial activity. *Nahrung*, v. 35, n.9, p. 930, 1991.

SOLÍS, G; REYES-GAVILAN, C. G.; FERNÁNDEZ, N.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**. Asturias, v. 16, n. 3 p. 307-310, 2010.

THOMPSON, R. Lysozyme and its relation to the antibacterial properties of various tissues and secretions. **Arch. Pathol.** v. 30, p. 1096-1134, 1940.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Guias práticas da OMGE: probióticos e prebióticos, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative study on breast-feeding: the quantity and quality of breast milk. Geneva, 1985.

VALENTA, C.; SCHWARTZ, E.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Lysozyme-caffeic acid conjugates: possible novel preservatives for dermal formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 174, p. 125-132, 1998.

VIEIRA, A. A.; SOARES, F. V. M.; PIMENTA, H. P.; ABRANCHES, A. D.; MOREIRA, M. E. L. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offet processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**. Rio de Janeiro, v. 87, n. 8, p. 577-580, 2011.

VAKIL, J. R.; CHANDAN, R. C.; PARRY, R. M.; SHAHANI, K. M. Susceptibility of Several Microorganisms to Milk Lysozymes. **J. Dairy Science**. Nebraska, v. 52, n. 8, p. 1192 – 1197, 1969.

VINAGRE, R. D.; DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. Leite humano: um pouco de sua história. **Pediatria**. São Paulo, v. 23, n. 4, p. 340-345, 2001.

VLKOVÀ, E.; MEDKOVÀ, J.; RADA, V. Comparison of four methods for identification of bifidobacteria to the genus level. **J. Food Sci**. Prague, v. 20, n. 5, p. 171-174, 2002.

WILLS, M. E.; HAN, V. E. M.; HARRIS, D. A.; BAUM, J. D. Short-time low-temperature pasteurization of human milk. **Early Human Development**. United Kingdom, v. 7, n.1, p.71-80, 1982.

XANTHOU, M. Innume Protect og Human Milk. **Biol Neonate**. Athens, v. 74, n. 2, p. 121 – 133, 1998.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. **PNAS**. Davis, v. 108, n. 1, p. 4653-4658, 2011.