



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIC

NAOMÍ SOUZA RODRIGUES
BRENO PEREIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO LEITE MATERNO E OS
POSSÍVEIS EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO NA INTEGRIDADE DA
LACTOFERRINA**

BRASÍLIA
2018



NAOMÍ SOUZA RODRIGUES

BRENO PEREIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO LEITE MATERNO E OS
POSSÍVEIS EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO NA INTEGRIDADE DA
LACTOFERRINA**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado a Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES
Orientação: Prof^a Dra. Anabele Azevedo Lima

BRASÍLIA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, primeiramente, a Deus por toda força e por sempre nos mostrar o melhor caminho para realizar essa pesquisa. À Profa Dra Anabele Lima por não nos deixar desistir, por sempre nos motivar, por toda paciência e dedicação. A senhorita é uma luz em nossas vidas. Agradecemos pela amizade e ensinamentos que contribuíram para realização dessa pesquisa

Agradecemos a equipe do Banco de Leite do Hospital Materno Infantil de Brasília, em especial a Ana Cláudia e a Fabíola, que embarcaram nessa pesquisa com a gente, por disponibilizarem o tempo precioso para nos ajudar e contribuíram com o aprendizado.

Agradecemos a equipe do LABOCIEN, em especial os técnicos que nos auxiliaram e ajudaram para a realização dos experimentos dessa pesquisa.

E a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente na produção dessa pesquisa, bem como, incentivaram a realização desse trabalho.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO LEITE MATERNO E OS POSSÍVEIS EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO NA INTEGRIDADE DA LACTOFERRINA

Naomí Souza Rodrigues – UniCEUB, PIC Institucional, aluna bolsista

naomisrodrigues@sempreceub.com

Breno Pereira Soares – UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário

bre.soares@sempreceub.com

Anabele Azevedo Lima – UniCEUB, professora orientadora

anabele.lima@ceub.edu.br

Após o nascimento, o lactente necessita de alimento capaz de atender suas insuficiências imunológicas e microbiológicas. Nesse sentido, o leite materno é ideal por possuir componentes de defesa, em especial, imunoglobulinas e proteínas antimicrobianas (lactoferrina). O colostro é o primeiro leite a ser secretado e possui uma rica concentração de proteínas quando comparado ao leite maduro que é secretado quinze dias após o parto. O processo de pasteurização tem por objetivo eliminar a transferência de patógenos através da amamentação, no entanto, isto demonstra ser capaz de desnaturar proteínas essenciais, reduzindo a capacidade de proteção do leite. Desse modo, esse projeto teve como objetivo, avaliar a atividade bactericida do leite materno antes e depois do processo de pasteurização térmico aplicável (63 °C) frente a bactérias patogênicas. As amostras foram coletadas no Hospital Materno Infantil de Brasília. Visando avaliar a eficácia antimicrobiana do leite materno, utilizou-se duas cepas bacterianas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas à 37°C. Dado isso, as cepas foram semeadas em ágar Mueller-Hinton com adição de discos embebidos de leite materno sobre as placas, e cultivadas por 24 horas à 37°C. Tal processo foi realizado com discos embebidos tanto com amostras de leite maduro como amostras de colostro antes e após o processo de pasteurização. Este foi dado pelo método térmico aplicável, o qual consistiu em submergir os tubos contendo as amostras de leite à água a temperatura de 63 °C por 30 minutos, e em seguida promover o choque térmico por meio da imersão dos frascos em água abaixo de 5°C. Das 18 amostras utilizadas 2 inibiram o crescimento bacteriano frente *Pseudomonas aeruginosa* formando halos de 1 cm e 1,4 cm; quanto inibir o crescimento frente a *Escherichia coli* 3 amostras demonstram ação antimicrobiana formando halos de 1,3 cm, 1 cm e 0,5 cm. Com base nesses resultados, é possível concluir que o leite materno possui ação antimicrobiana, no entanto, se faz necessário a realização de mais pesquisas com intuito definir melhor essa ação.

Palavras-Chave: Avaliação bactericida. leite materno. pasteurização

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
3. METODOLOGIA	5
3.1 Coleta das amostras	5
3.2 Avaliação quantitativa da eficácia antimicrobiana do leite materno.	6
3.2.1 Preparo das cepas bacterianas	6
3.2.2 Ensaio quantitativo	6
3.3. Avaliação qualitativa da eficácia antimicrobiana do leite materno	6
3.3.1 Preparo das cepas bacterianas	6
3.3.2 Ensaio qualitativo	7
3.4 Pasteurização	7
4. RESULTADOS	8
4.1 Relação entre perfil de doadoras e tempo de coleta:	8
4.2. Avaliação qualitativa da eficácia bactericida das fases do leite materno	10
4.3. Avaliação quantitativa da eficácia bactericida das fases do leite materno	14
5. DISCUSSÃO	14
6. CONCLUSÃO	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXOS	21

1. INTRODUÇÃO

O leite materno por possuir todos os nutrientes primordiais é considerado como o alimento ideal para o recém-nascido, uma vez que esse necessita de fatores imunológicos, nutricionais e microbiológicos nesse período da vida. Sua composição sofre modificações conforme o tempo de lactação que parecem coincidir com as necessidades nutricionais variáveis da lactante (PASSANHA, MANCUSO & SILVA, 2010).

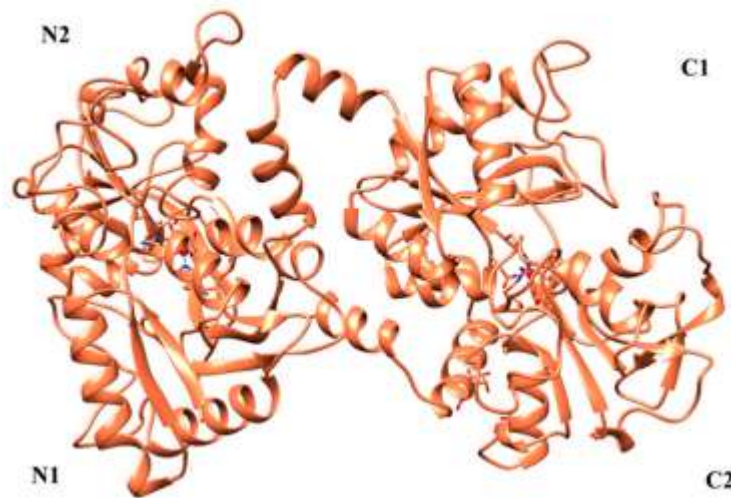
Nos primeiros momentos após o parto é formado o colostro, e somente depois do décimo quinto dia de vida têm-se o leite maduro. O colostro quando comparado ao leite maduro apresenta maiores concentrações de proteínas, vitaminas, e em especial as do complexo B1 e B11, além de componentes de defesa, como as imunoglobulinas, substâncias imunomoduladoras, agentes antiinflamatórios e antimicrobianos. Porém, apresentam em ambas fases a lactoferrina (CALIL & FALCÃO, 2003).

A lactoferrina (Lf) é uma proteína não heme ligada ao ferro que faz parte da família da proteína transferrina presente no leite materno e em secreções externas. É a segunda proteína funcional mais abundante presente na fração de soro do leite humano, compreendendo cerca de 25% do soro de leite. Atua no desenvolvimento gastrointestinal e na proteção do organismo, dentre elas possuem ação antimicrobiana (DESHANIE et al., 2014).

A Lf é produzida e liberada por células epiteliais da mucosa e neutrófilos em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, bovinos, vacas, cabras, cavalos, cães e roedores. É uma proteína glicosilada de 80 kDa e cerca de 700 aminoácidos com alta homologia entre as espécies (figura 1). Sua estrutura tridimensional consiste em uma única cadeia polipeptídica enovelada em dois lóbulos simétricos (lóbulos N e C) que podem ser homólogos entre si (33% – 41% de homologia) (GIANSANTI et al., 2016).

Sua atividade antimicrobiana é dada por dois mecanismos diferentes: o primeiro, e principal, é ligar-se aos íons de ferro, que são fundamentais para a proliferação de microrganismos patogênicos, um efeito bacteriostático consiste em impossibilitar os microrganismos de utilizar esse mineral para o seu metabolismo. Enquanto que o segundo, refere-se a uma interação direta com o patógeno ao se ligar a lipopolissacarídeos de membrana e produzir peróxidos catalisados por íons de ferro afetando a permeabilidade da membrana e resultando em lise das células bacterianas (ANTONINI et al., 2016; PASSANHA, MANCUSO & SILVA, 2010).

Figura 1: Estrutura tridimensional da lactoferrina



Fonte: GIANANTI et al, 2016.

Um estudo na UTI neonatal realizado por Sgro et al. (2011) mostrou que os microrganismos mais encontrados em sepse neonatal foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A sepse é um conjunto de manifestações graves em todo o organismo produzidas por uma infecção podem ocorrer por um grande número de bactérias patogênicas, e é considerada a infecção mais grave do neonato, podendo ser prevenida com a ação da lactoferrina.

E. coli é um bastonete curto Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae e está muito presente em sepse neonatal. Além disso, pode estar relacionada a diarreia aguda em prematuros e constantemente encontra na microbiota intestinal, em pouca quantidade é considerada comensal, mas quando aumentada secreta toxinas que causam danos às células (NEPOMUCENO, 2015; CAMPOS, 2012).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete gram-negativo pertencente à família Pseudomonadaceae. É considerada oportunista, ou seja, seu crescimento é devido uma fragilidade imunológica. Além disso, apresenta uma grande resistência a antibióticos. Têm sido encontradas em diversos ambientes, especialmente em hospitais, tornando-se um patógeno de suma relevância em infecções hospitalares (NASCIMENTO, 2013; CAMPOS, 2012).

Quando o leite materno não está disponível para alimentar recém-nascidos ou prematuros a Organização Mundial de Saúde (OMS) indica a doação, visto a sua vasta importância biológica, e para que essa ocorra é necessário realizar alguns procedimentos, como

a pasteurização. Essa consiste em um método térmico aplicável ao leite materno que exerce a inativação de microrganismos mais termorresistente. Esse tratamento não visa a esterilização do leite, no entanto, uma mortalidade que possa garantir a inativação de grande parte dos microrganismos patogênicos (BRASIL, 2008; COUTSOUDIS et al., 2017).

SILVA (2008) cita um estudo realizado com o objetivo de determinar o efeito da pasteurização sobre a quantidade de ferro, cobre e zinco em colostro de mães de bebês pré-termo e termo. Os autores perceberam que houve uma redução na concentração dos minerais citados, indicando que a pasteurização diminuiu os níveis dos mesmos. Mas não abordaram sobre a dosagem da lactoferrina após o método térmico mencionado.

Diante do exposto, a pesquisa teve por objetivo avaliar a ação antimicrobiana do leite humano nas fases de colostro e leite maduro, bem como, investigar se há possibilidade de a pasteurização interferir na concentração de lactoferrina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Campos et al. (2013), classifica o leite humano como sendo o melhor alimento para ser administrado a recém-nascidos, por possui em sua composição componentes que desempenham atividades imunológicas, dentre os quais se ressalta a capacidade antimicrobiana da lactoferrina.

De acordo com a revisão não sistemática de Júnior (2013), a lactoferrina possui mecanismos distintos os quais conferem ação antimicrobiana. Um desses, corresponde à capacidade da proteína ligar-se a molécula de ferro impossibilitando o acesso desse nutriente pelas bactérias, acarretando a inibição do crescimento bacteriano. No entanto, essa ação bacteriostática é influenciada pelo estado de saturação, de modo que, quanto menor a saturação em ferro, melhor será a afinidade ao ferro. Nesse sentido, a lactoferrina presente no leite materno possui saturação aproximadamente de 5 a 8%, enquanto que, o leite bovino apresenta uma saturação em torno de 15 a 20%, portanto, o leite humano dispõe maior ação antimicrobiana comparada à lactoferrina do leite bovino.

Embleton (2013) afirma que, a capacidade de sequestrar ferro da lactoferrina interrompe a formação de biofilmes, visto que, a diminuição da disponibilidade dessa molécula leva as bactérias a “se movimentarem” em busca desse íon interrompendo os biofilmes que dependem de bactérias estáticas. Tal biofilme confere virulência a bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*.

Júnior (2013) descreveu outro mecanismo contra o crescimento bacteriano presente na lactoferrina é referente a capacidade de ligação com a superfície da célula bacteriana. A

lactoferrina demonstra interação direta com constituintes lipopolissacarídeos - lipídios aniônicos A - da parede celular de bactérias Gram-negativas. Tal interação pode provocar deterioração na membrana celular proporcionando alterações na sua permeabilidade, bem como, permitindo a liberação de lipopolissacarídeos. E, em bactérias Gram-positivas a proteína tem interação com o ácido lipoteicóico, componente da parede celular dessas bactérias, tendo um efeito semelhante às bactérias Gram-negativas.

Embleton (2013) explica uma das funções da lactoferrina, como sendo a capacidade dessa proteína se ligar a receptores de células hospedeiras de agentes patogênicos, tais como vírus e bactérias, e por competição a lactoferrina pode reduzir a endocitose de microorganismos os quais poderiam escapar da resposta imune, esse mecanismo é utilizado por algumas cepas de *Escherichia coli*. Essa mesma bactéria pode produzir.

Segundo explica Wang (2013), a pasteurização foi desenvolvida como um método de eliminar a transferência de patógenos através do leite materno para neonatos e prematuros, os quais possuem maior vulnerabilidade a esses patógenos, visto que, a sua imunidade está imatura. Diante disso, a imunidade passiva fornecida através do leite confere proteção suficiente contra infecções por meio de anticorpos maternos e proteínas bioativas (tais como a lactoferrina). No entanto, a pasteurização pode induzir modificações desses nutrientes do leite. Em seu estudo foi demonstrado um decréscimo substancial na concentração de lactoferrina no leite humano pasteurizado a temperaturas de 62,5°C. Coutsoudis (2017) em sua pesquisa a qual analisava os efeitos da pasteurização sobre os agentes imunes do leite humano, também demonstrou que houve uma redução na concentração de lactoferrina, 36%, após ser administrado o processo de pasteurização pelo método térmico aplicável (62,5°C).

Wang (2013), em sua pesquisa foi observado uma elevação significativa na proliferação bacteriana em leites após o processo de pasteurização. Em geral, as proteínas tendem a desnaturar mais rapidamente com o aumento da temperatura. Nesse sentido, a partir da revisão de estudos anteriores pode se concluir que tratamentos térmicos com temperaturas abaixo de 62,5°C têm um impacto mínimo sobre lactoferrina enquanto que tratamentos térmicos acima de 62,5°C tornam estas proteínas mais rapidamente inativadas. Quando se aquece até 70-73°C, poucas proteínas sobrevivem.

Gazzolo (2016), em seus estudos que analisava o perfil protéico, a partir de uma técnica semi quantitativa (análise de GeLC- MS), após a pasteurização das duas fases do leite humano, colostro e leite maduro, concluiu que houve uma pequena diminuição nas concentrações de proteínas totais do leite, incluindo a lactoferrina, após o processo de pasteurização. E, dentre as

fases do leite, o colostro demonstrou diminuições mais significativas quando comparado ao leite maduro. Diante disso, os autores também destacam a necessidade de novos estudos para analisar se existem alterações no teor proteico do leite humano em suas diferentes fases decorrentes de tratamentos térmicos, por meio de métodos diferentes dos quais ela fez uso.

3. METODOLOGIA

A proposta de estudo foi desenvolvida pelos estudantes de Biomedicina Breno Pereira Soares e Naomí Souza Rodrigues nas dependências dos Laboratórios de Ciências (LABOCIEN) do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB. Os procedimentos do experimento foram igualmente distribuídos entre os dois estudantes.

A avaliação da atividade bactericida do leite materno, nas fases de leite maduro e colostro foram analisadas pela avaliação quantitativa e qualitativa antes e após o processo de pasteurização. Os experimentos foram realizados em triplicata. No entanto, não foi possível examinar a integridade da lactoferrina após o processo de pasteurização devido problemas na aquisição do teste de imunoenensaio o qual seria utilizado para a análise de tal proteína. Sendo assim, empregada parte da metodologia proposta inicialmente, com o objetivo da efetivação do projeto.

3.1 Coleta das amostras

As amostras de leite materno foram doadas de mães internadas na enfermaria Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) e doadoras do Banco de Leite Humano desse hospital. A coleta foi realizada sob o auxílio de enfermeiras responsáveis pelo ato em uma sala privativa para resguardar a identidade da participante, após as doadoras serem instruídas verbalmente quanto a procedimentos de higiene para coleta e antissepsia das mãos, assim como orientações acerca da coleta. Não houve critérios de seleção de doadoras sendo convidadas a participar todas as mães que estavam internadas na enfermaria do hospital, e aquelas que doam ao Banco de Leite Humano do HMIB. Contudo, foi adotado como critério de exclusão doadoras que fizeram uso de antibióticos nos últimos 30 dias. As amostras foram transferidas para tubos estéreis com tampa (5mL), tubos Falcon, identificados com data/horário da coleta e dia nascimento do lactente.

Antes da coleta foi disponibilizado o Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TCLE) para as doadoras, bem como, foi dada uma explicação sobre o projeto e razão pela qual

a doadora foi convidada a participar sendo recebido somente amostras de leite a mediante a assinatura do TCLE que autoriza a utilização das amostras.

O transporte das amostras foi realizado em caixas térmicas específicas sob refrigeração, por meio de gelo reutilizável rígido (Gelox), com a temperatura controlada por termômetro presente na caixa. O armazenamento foi dado em tubos Falcon, identificados, sob refrigeração (de 4°C a 6°C) no Laboratório de Ciências do UniCEUB, o qual foi utilizado para a realização dos experimentos.

3.2 Avaliação quantitativa da eficácia antimicrobiana do leite materno.

A constatação quantitativa da eficácia bactericida do leite materno segue a metodologia proposta por Campos (2013). Essa verificação foi realizada antes e após o processo de pasteurização.

3.2.1 Preparo das cepas bacterianas

Para tal avaliação foram utilizadas as cepas ATCC das bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em ágar Ágar Mueller Hinton por 24 horas à 37°C. Nesse sentido, foram selecionadas uma colônia, de cada cultivo, e ressuspendidas em solução fisiológica, a fim de se obter uma diluição a uma concentração 10^8 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias) correspondente a turvação 0,5 da escala de Mac-Farland.

3.2.2 Ensaio quantitativo

A partir da suspensão das cepas, adicionou-se 1mL da solução fisiológica em 1 mL de leite materno. Após isso, a solução e o leite foram homogeneizados por meio do agitador magnético 5.000 rpm, com o auxílio de um *swab* estéril foi feito o cultivo dessa solução em Ágar Mueller Hinton, sob placa de Petri, levando à incubação por 24 horas a 37° C. Após o tempo de incubação foi feita a leitura, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias. Tal ensaio foi feito antes e após a pasteurização.

3.3. Avaliação qualitativa da eficácia antimicrobiana do leite materno

3.3.1 Preparo das cepas bacterianas

Para a realização do ensaio qualitativo foram utilizadas cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em Ágar Mueller Hinton por 24 horas à 37°C para cada cepa.

3.3.2 Ensaio qualitativo

Com o auxílio de *swab* estéril foram cultivadas as cepas bacterianas em Ágar Mueller Hinton presentes em placas de Petri. Dado isso, sob os cultivos foram posicionados discos de papel filtro esterilizados embebidos de amostras de leite materno, sendo cada disco referente a uma amostra, respeitando uma distância padrão para os 4 discos, em todas as amostras. Após tais procedimentos, as placas foram incubadas por 48 hrs em estufa bacteriológica a 37°C. Ressaltando que o ensaio foi realizado antes e após o processo de pasteurização.

3.4 Pasteurização

As amostras coletadas (colostró e leite maduro) passaram pelo processo de pasteurização, seguindo as normas da ANVISA (2007). O primeiro passo foi regular o banho-maria à temperatura de 63°C e esperar que o mesmo se estabiliza. Em seguida, os tubos contendo as amostras leites foram totalmente submerso em água quente. E dado a marcação do tempo de letalidade térmica (30 minutos), a partir do momento em que a temperatura do leite humano atingiu 63°C. Após os 30 minutos relativos à letalidade térmica, foi feito o resfriamento dos tubos até que o leite humano atingisse uma temperatura igual ou inferior a 5°C. O resfriamento dos frascos foi obtido através da imersão dos mesmos em um banho contendo água e gelo. Em seguida, foi aplicado o choque térmico sob as amostras.

4. RESULTADOS

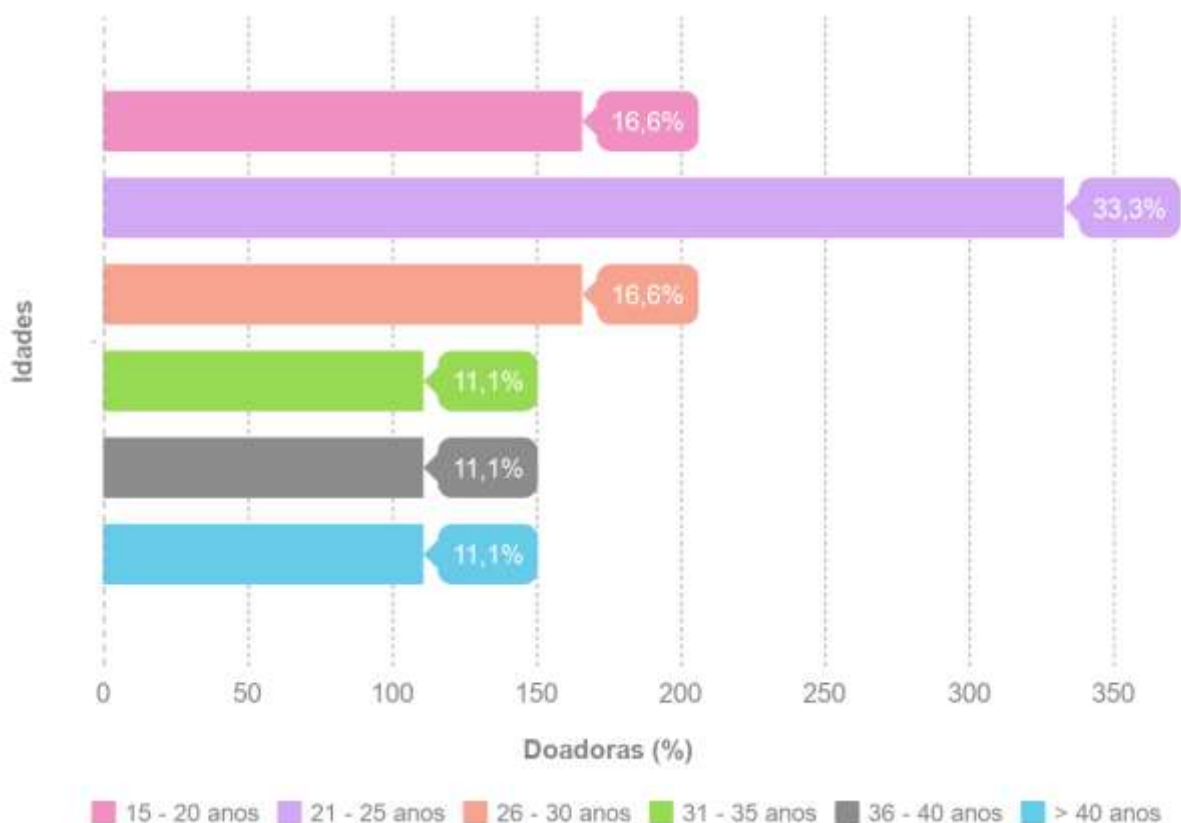
4.1 Relação entre perfil de doadoras e tempo de coleta:

Das mães abordadas, foram coletadas 18 amostras de colostro e 10 amostras de leite maduro. Ao longo da pesquisa, 10 mães se recusaram a participar da pesquisa alegando problemas em doar amostra por falta de produção.

O maior número de doadoras de colostro tinha idade entre 21 e 25 anos representando 33% das amostras, como apresenta o Gráfico 1. Enquanto que, 40% das doadoras de leite maduro tinham idades entre 31 e 35 anos, conforme mostra a Figura 1.

Das amostras de colostro 50% possuíam de 1 a 3 dias contados desde o dia do parto até o dia da doação assim como mostra o Gráfico 2. E 70% das amostras de leite maduro possuíam de 15 a 20 dias (Gráfico 3).

Gráfico 1: Idade das doadoras de colostro



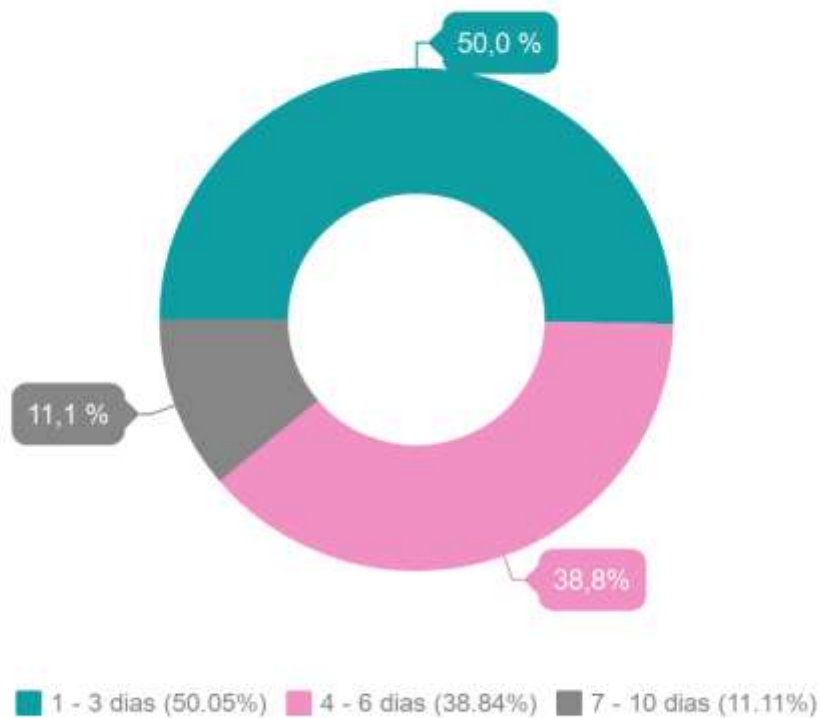
Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 1: Idade das doadoras de leite maduro



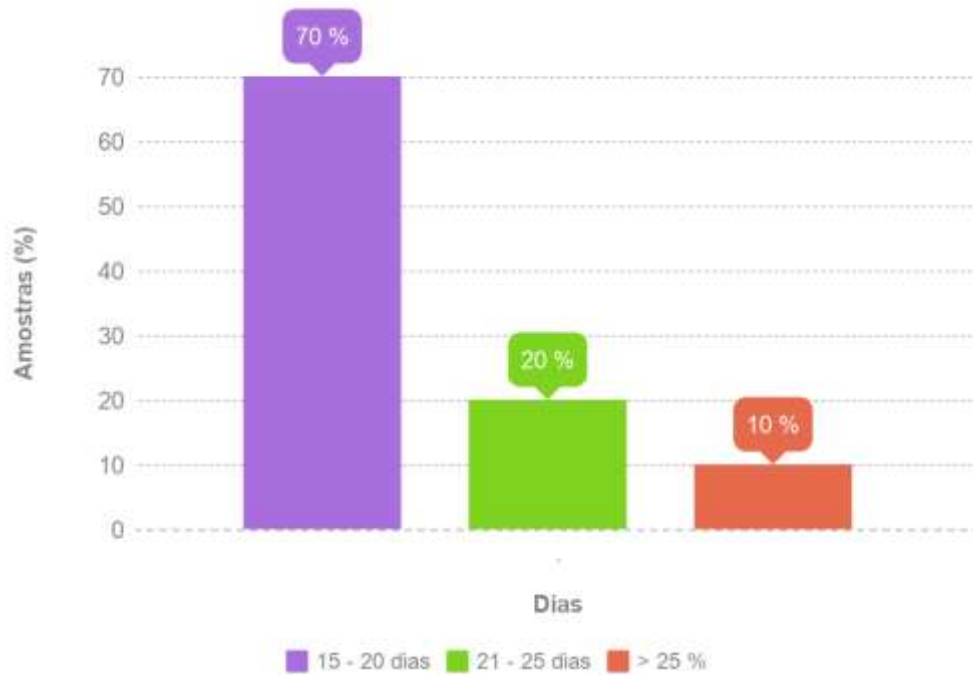
Fonte: Elaborado pelos autores

Gráfico 2: Número de dias, das amostras de colostro, a partir da data do parto até a data da coleta.



Fonte: Elaborado pelos autores

Gráfico 3: Número de dias, das amostras de leite maduro, a partir da data do parto até a data da coleta



Fonte: Elaborado pelos autores

4.2. Avaliação qualitativa da eficácia bactericida das fases do leite materno

Das 18 amostras de colostro analisadas 4 formaram halo de inibição. Dessas, em 2 amostras foram observadas atividades bactericidas diante de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e outras 2 amostras em relação a cepas de *Escherichia coli*. Essa inibição foi dada por tais amostras antes do processo de pasteurização, não sendo observado inibição do crescimento bacteriano a partir das amostras que passaram pela pasteurização, como mostra as Figura 2, 3, 4 e 5. Em relação ao leite maduro, não houve formação de halo de inibição de crescimento bacteriano em nenhuma das 10 amostras analisadas antes e depois do processo de pasteurização.

Figura 2: Análise qualitativa do colostro antes (2A) e após (2B) o processo de pasteurização em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

(2A)



(2B)



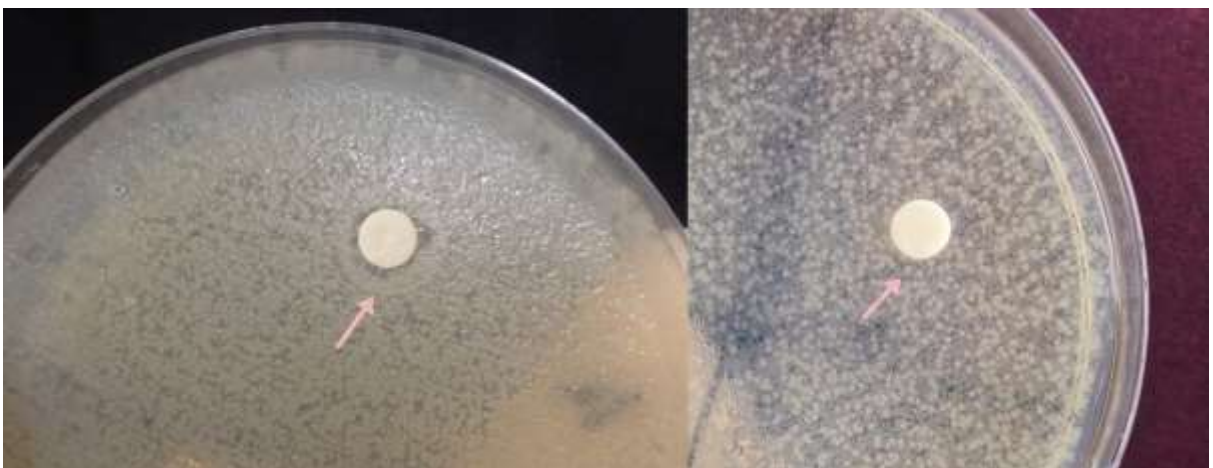
Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 3: Análise qualitativa do colostro antes (3A) e depois (3B) o processo de pasteurização em cepas de *Escherichia coli*

(3A)

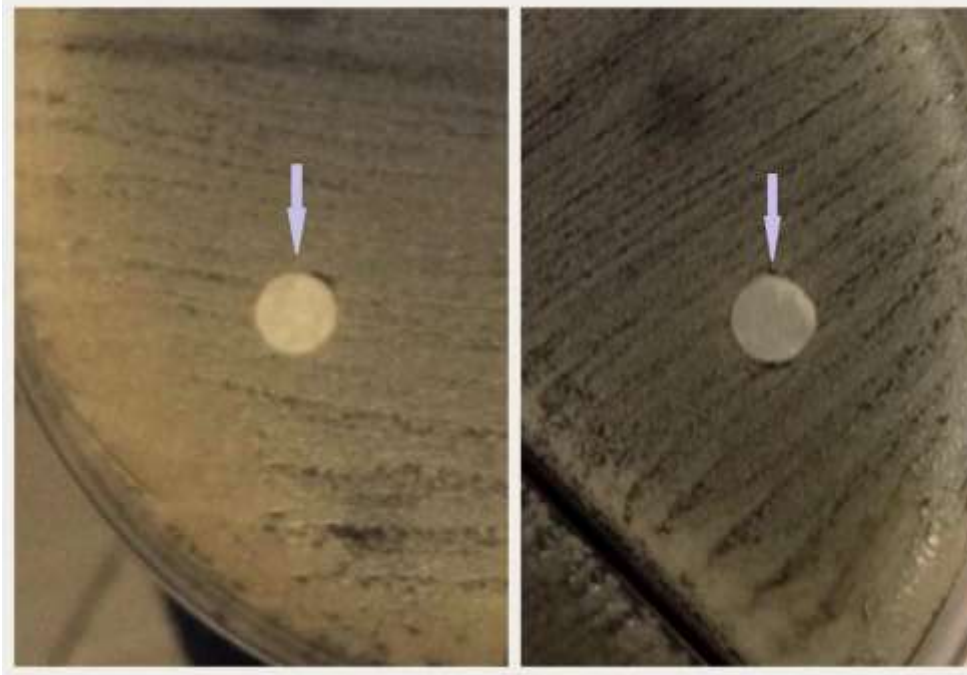


(3B)



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 4: Análise qualitativa do leite maduro antes (4A) e após (4B) o processo de pasteurização em cepas de *Escherichia coli*



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 5: Análise qualitativa do leite maduro antes (5A) e após (5B) o processo de pasteurização em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Elaborado pelos autores

4.3. Avaliação quantitativa da eficácia bactericida das fases do leite materno

Não obtivemos sucesso na análise quantitativa das amostras de leite materno para ambas linhagens, e quando submetidas ao processo antes e após pasteurização. Não houve número suficiente de amostras analisadas para se calcular os dados estatísticos e obter média e desvio padrão. Embora, das 28 amostras analisadas submetidas à diluição, as placas apresentaram número de colônias acima de 1000/UFP (Unidades formadoras de placas). Sendo assim, novos testes deverão ser conduzidos visando a complementação da análise.

5. DISCUSSÃO

Avaliando a população de doadoras deste estudo pode se concluir que essa é composta de mães adultas, em que a maioria possui idade superior a 21 anos tanto doadoras de colostro quanto doadoras de leite maduro. Os resultados alcançados na análise qualitativa das amostras de colostro correlacionam se com idade das mães, visto que, a composição do leite materno de mães adultas possui maior quantidade de nutrientes quando comparado com leite materno de mães adolescentes, uma vez que essas ainda estão em período de crescimento. No entanto, os resultados obtidos na análise do leite maduro se contrapõem a relação de nutrientes presente no leite materno e idade das mães (CAMPOS, 2013; MORAN, et al., 2010).

Das amostras de colostro coletadas 50% tinham de 1 - 3 dias de lactação, contados a partir da data de nascimento do lactente até a data da coleta, tal resultado sugere que metade das amostras utilizadas no estudo possuíam as maiores concentrações de lactoferrina, pois segundo estudos, os quais compararam as concentrações de lactoferrina em amostras de leite maduro e colostro, nos primeiros cinco dias após o parto é onde tem se as maiores concentrações de lactoferrina. Esse achado pode se associar a formação de halos de inibição de crescimento bacteriano em amostras de colostro em consequência da maior concentração do principal fator antimicrobiano do leite (RAI et al., 2014; VILLAVICENCIO et al., 2017).

Segundo esses mesmos estudos, do intervalo de 6 - 10 dias de lactação ocorre uma diminuição em 50% da concentração de lactoferrina presente no leite materno, e após os 30 dias de lactação tal concentração atinge o platô. Desse modo, os achados deste estudo se associam a literatura, uma vez que, as amostras de leite maduro analisadas não formaram halo de inibição de crescimento bacteriano, o que pode estar relacionado a menores concentrações de lactoferrina em virtude de tais amostras disporem de mais de 15 dias de lactação (RAI et al., 2014; VILLAVICENCIO et al., 2017).

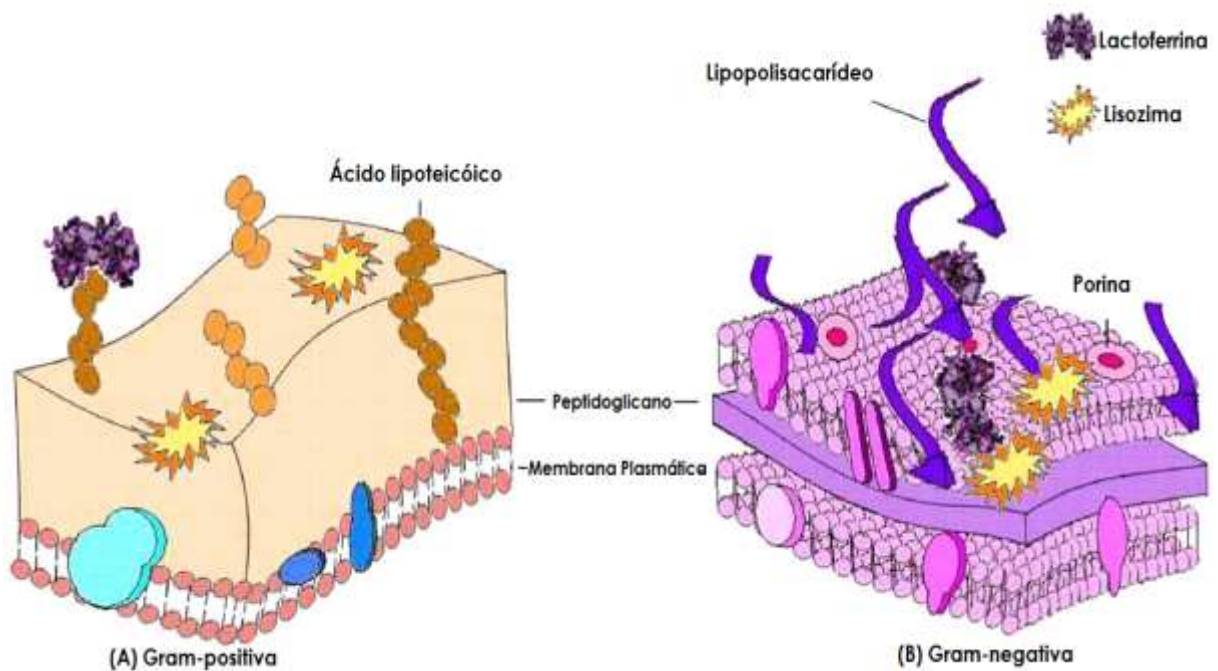
Nesse contexto, sugere-se que a lactoferrina seja a principal contribuinte para a formação do halo de inibição de crescimento bacteriano observado na análise qualitativa da eficácia bactericida das amostras de colostro, antes da pasteurização, visto que, essa é considerada um elemento essencial na primeira linha de defesa do hospedeiro devido a sua eficácia em resposta a uma variedade de mudanças ambientais e fisiológicas. A conformação estrutural da lactoferrina garante a ação da homeostase do ferro o que acarreta uma forte atividade bactericida de amplo espectro, uma vez que, essa enzima possui a capacidade de absorver íons Fe^{3+} diminuindo a quantidade desse nutriente por bactérias o que inibe o crescimento desses microrganismos, assim como a expressão de seus mecanismos de virulência. Em razão que, essa atividade antibacteriana da lactoferrina é contrabalanceada através de três mecanismos principais utilizados pelas bactérias patogênicas: (1) produção de quelantes de íons férricos, denominados siderófilos, os quais possuem alta afinidade; (2) endocitose das principais moléculas de ligação ao ferro, ex.: lactoferrina, transferrina, hemoglobina e haptoglobinas, por meio de receptores; (3) transporte passivo de ferro através da redutase bacteriana a qual reduz íons férricos a ferrosos e esses adentram passivamente para o interior das células bacterianas (GONZÁLEZ - CHÁVEZ et al., 2009; ROSA et al., 2017).

Além disso, a lactoferrina possui outros mecanismos bactericidas independentes de ferro, dentre eles está a capacidade de interação direta com o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana celular de bactérias Gram-negativas, e com o ácido lipoteicoico, encontrado na parede celular de bactérias Gram-positivas. Tal capacidade bactericida está localizada na região N-terminal onde seu peptídeo catiônico, denominado lactoferrina, interage com LPS causando um aumento na permeabilidade na membrana o que gera danos às bactérias. Essa interação com LPS também contribui para a ação de antimicrobianos naturais, ex.: lisozimas, de modo que potencializa a ação desses. Em relação aos efeitos antimicrobianos em bactérias Gram-positivas, a carga líquida positiva presente na lactoferrina liga-se às moléculas aniônicas, como ácido lipoteicoico, presentes na superfície da parede celular bacteriana acarretando em uma diminuição de carga negativa na parede celular bacteriana proporcionando um efeito enzimático gerado pela lisozima e o peptidoglicano adjacente. Esses mecanismos estão ilustrados na Figura 6 (GONZÁLEZ - CHÁVEZ et al., 2009; ROSA et al., 2017).

Todos esses mecanismos foram contribuintes para inibição do crescimento das cepas utilizadas neste estudo. Sendo assim, vale ressaltar que a lactoferrina, além dos mecanismos antimicrobianos já mencionados, possui mecanismos que afetam diretamente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Com relação às cepas de *Escherichia coli*, a

lactoferrina impede a entrada desses microrganismos em fagócitos não profissionais (ex.: células epiteliais), a entrada dessas bactérias nessas células geram a essas cepas um nicho de proteção em que possibilita a replicação, e impede o sistema de defesa do hospedeiro, essa entrada se dá pela ligação das invasinas (proteínas presentes na membrana externa da células bacterianas) com receptor da integrina presente na membrana do hospedeiro, e é nessa ligação que a lactoferrina atua, pois essa proteína se associa nos mesmos sítios de ligação presente nas integrinas que iriam ligar se às invasinas, impedindo a internalização de cepas de *Escherichia coli*. Portanto, a inibição do crescimento das cepas utilizadas por amostras de colostro anteriores a pasteurização pode ser esclarecida por esses mecanismos (EMBLETON et al., 2013; ROSA et al., 2017).

Figura 6 - Mecanismos de ação bactericida da lactoferrina



Legenda: (A) Bactérias Gram-positivas: lactoferrina interagindo com ácido lipoteicoico, moléculas de carga negativa, possibilitando ação de outros compostos antimicrobianos como a lisozima. (B) Bactérias Gram-negativas: lactoferrina liga se a lipopolissacarídeo, gerando a saída desse lipídio e consequentemente danos à membrana da célula bacteriana.

Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ - CHÁVEZ et al., 2009.

No entanto, não foi possível observar a formação de halos de inibição em amostras de leite maduro antes e após a pasteurização. Apesar dessas amostras possuírem moléculas com atividade bactericida, como a lactoferrina, tal resultado pode ser justificado por fatores que

alteram a concentração desta no leite. De acordo com Rai et al (2014), a concentração de lactoferrina na fase madura do leite pode chegar a duas vezes menor que a fase colostro. As Figuras 4 e 5 mostram a não formação de halo de inibição antes e depois da pasteurização, assim como no estudo proposto por Campos (2013). A quantidade de lactoferrina presente no leite maduro foi insuficiente para inibir o crescimento bacteriano, uma vez que depende de fatores como a alimentação. Além disso, na revisão realizada por Villavicencio (2017), a concentração de lactoferrina pode ser afetada por questões como estado nutricional, fumar durante a gestação, mastite materna, prematuridade e paridade.

O resultado da não formação de halo de inibição do crescimento bacterianos após a pasteurização em amostras de colostro, é sugestivo de que a alta temperatura do processo de pasteurização seja capaz de destruir componentes presentes no leite, mas algumas moléculas bioativas são pelo menos parcialmente preservadas. Segundo o estudo de Ewaschuk e Unger (2015), as moléculas mantidas contribuíram para resultados observados em bebês prematuros alimentados com leite de doadores pós-pasteurizado. De acordo com as Figuras 2 e 3, após a pasteurização não foi possível inibir o crescimento bacteriano, uma vez que a lactoferrina é lábil ao calor, assim como vitamina C, tiamina, riboflavina, folato são de grande preocupação médica. No entanto, esses riscos devem ser reduzidos pelo uso de fortificantes nutrientes, normalmente adicionados ao leite humano (EWASCHUK & UNGER, 2015; PEILA et al, 2016).

6. CONCLUSÃO

A lactoferrina é uma proteína não heme ligada ao ferro que tem como principal objetivo a ação contra microrganismo, uma vez que possui a capacidade de absorver íons Fe^{3+} diminuindo a quantidade desse nutriente por bactérias, por isso inibe o crescimento desses microrganismos. A fase colostro do leite materno apresenta uma maior quantidade dessa enzima, dessa forma, foi possível formar um halo de inibição contra as duas cepas bacterianas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Tal inibição foi apenas observada antes do processo de pasteurização, de modo que houve formação de halos de inibição depois do processo de pasteurização. Acredita -se que a pasteurização térmico aplicável, seja um dos contribuintes para menor concentração de lactoferrina nas amostras de leite. No entanto, no presente estudo não foi possível avaliar as concentrações de lactoferrina antes e após o processo de pasteurização nas amostras de leite materno, visto que se trata de um kit caro e a verba foi insuficiente para tal aquisição.

Da mesma forma, se acredita que leite maduro possui uma quantidade inferior de lactoferrina quando comparado ao colostro. Com isso, não foi capaz de formar halo de inibição, uma vez que depende de fatores como a alimentação para aumentar a produção dessa enzima e promover a ação antibacteriana. Porém, devido à falta de kit para a dosagem da lactoferrina em ambas as fases do leite materno não possível avaliar a concentração dessa enzima.

Portanto, se faz necessário a realização de mais estudos os quais possam avaliar as concentrações de lactoferrina antes e após a pasteurização, de modo que avalie se esse processo acarreta em prejuízo na concentração dessa proteína, bem como, diminui a capacidade bactericida do leite materno. Além disso, avaliar qual fase do leite materno possui maior concentração de lactoferrina e conseqüentemente maior ação antimicrobiana, e qual fase do leite materno pode ser afetada pelo processo de pasteurização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONINI, G. *et al.* Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. **Pharmaceuticals**. Itália. v.:10.3390, n.9040061, p. 9-15, set..2016.
- ANVISA - **Banco de Leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2008.
- CALIL, V.M.L.T.; FALCÃO, M.C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**. São Paulo. v.82, n.4, p.1-10, dez.2003.
- CAMPOS, L.F. **A influência da aditivação do leite humano no crescimento bacteriano in vitro**. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- COUTSOUDIS, A. *et al.* The Effect of Simulated Flash-Heat Pasteurization on Immune Components of Human Mil. **Nutrients**. Estados Unidos. v.9, n.9020178, p.1-12, fev.2017.
- EMBLETON, N.D. *et al.* Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. Nova York. v.18, n. 144, p.143-149, mar. 2013.
- EWASCHUK, J.B., UNGER, S. Human milk pasteurization: benefits and risks. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**. Londres. v. 18, n.3, p. 269-275, maio, 2015.
- GIANSANTI, F. *et al.* Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. **Pharmaceuticals**: London, v. 9, n. 4, p. 61, set. 2016.
- GONZÁLEZ- CHÁVEZ, S. A. *et al.* Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Los Angeles. v. 33, n. 1, p. 301 – 308, agosto.2009.
- MORAN, H. V. *et al.* Nutritional requeriments during lactation. Towards European alignment of reference values: the EURRECA network. **Maternal & Child Nutrition**. Londres. v. 6, n. 2, p. 39 – 54, jan. 2010
- NASCIMENTO, A.L.D.R. **Ação antimicrobiana do extrato de Eugenia Uniflora L. (pitanga) sobre Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli**. 2013. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- NEPOMUCENO, L.L. **Susceptibilidade antimicrobiana de Escherichia Coli isoladas de aves abatidas sob inspeção no estado do Tocantins**. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Araguaína, 2015.
- PASSANHA, A.; MANCUSO, A.M.C.; SILVA, E.M.P. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**. São Paulo. v.20, n.2, p.351-360, jan. 2010.

QUEIROZ, V.A.O. *et al.* Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. **Revista Paulista de Pediatria**. Salvador. v.31 n.90-5, maio. 2013.

RAI, D. *et al.* Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. **Critical reviews in food science and nutrition**. Londres. v. 54, n. 12, p. 1539-1547, maio. 2014.

ROSA. L. *et al.* Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences** Colúmbia Britânica.v.18, n.1985, p.1- 26, set. 2017.

SGRO, M., *et al.* Early-onset neonatal sepsis: rate and organism pattern between 2003 and 2008. **Journal of Perinatology**. Canada. v.31, n.12, p.794–798, 2011.

SILVA, F.F. **Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminos bioativas**. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Belo Horizonte, 2008.

VILLACICENCIO, A. *et al.* Factors Affecting Lactoferrin Concentration in Human Milk: How Much Do We Know. **Biochemistry Cell Biology**. Moscow v.95, n.1, p. 12 -21, fev. 2017.

WANG, T.W., *et al.* Influence of Prolonged Storage Process, Pasteurization, and Heat Treatment on Biologically-active Human Milk Proteins. **Elsevier Taiwan LLC Pediatrics and Neonatology**. Taiwan. v.54 p.360 – 366, maio. 2013.

ANEXOS



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Avaliação da Atividade Bactericida do Leite Materno e os Possíveis Efeitos da Pasteurização na Integridade da Lactoferrina
Centro Universitário de Brasília
Pesquisador(a) responsável: Anabele Azevedo Lima
Pesquisadores: Breno Pereira Soares e Naomi Souza Rodrigues

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa acima citado. O texto abaixo apresenta todas as informações necessárias sobre o que estamos fazendo.

Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitada a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo.

Antes de assinar, faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

O objetivo deste estudo é: Avaliar a ação bactericida do leite humano, bem como, investigar se há possibilidade de a pasteurização interferir na concentração de lactoferrina (uma proteína que possui ação contra bactérias) presente na composição do leite.

Sua participação consiste em doar voluntariamente uma amostra de leite materno, e para a obtenção dessa será necessária a coleta de modo manual ou por meio de bombas de sucção e em ambos os casos antes da coleta será dada as instruções necessárias para tal ato. Para resguardar sua identidade as enfermeiras do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIIB) coletarão o leite em uma sala reservada para que se sinta confortável durante a coleta.

A pesquisa será realizada em um dos laboratórios localizado no Centro Universitário de Brasília UniCEUB, campus Asa Norte.

Riscos e benefícios

Este estudo possui riscos mínimos sendo eles: prováveis desconfortos e constrangimentos no ato da coleta. Contudo, para minimizar esses riscos a doadora poderá optar por realizar a coleta pelo método manual ou pelo uso de bombas de sucção. Bem como, a lactante poderá optar por realizar a coleta sozinha após instruções da enfermeira responsável pela coleta de leite materno. Além disso, a doadora poderá interromper o procedimento a qualquer momento.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar, portanto, poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Tal como, solicitar a devolução da amostra em qualquer momento da pesquisa, e os pesquisadores responsáveis, caso ainda tenha parte ou toda a amostra, deverão devolvê-la. Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade

Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

Os dados e instrumentos utilizados, ex.: frascos da amostra, ficarão guardados sob a responsabilidade dos pesquisadores com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade.



Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade. Se houver alguma consideração ou dúvida referente aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Brasília – CEP/Uniceub, pelo telefone 3966.1511 ou pelo e-mail cep.uniceub@uniceub.br. E pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) pelo telefone 3325.4955 ou pelo email comitedeetica.secretaria@gmail.com que aprovaram esse estudo. Também entre em contato para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo.

Eu, _____ RG _____, após receber a explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos nesta pesquisa concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Este Termo de Consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a senhora.

Brasília, ____ de _____ de _____.

Participante

Anabele Azevedo Lima/ celular (61) 99616-9858 e/ou anabele.lima@uniceub.com

Breno Pereira Soares/celular (61) 99668-7822 e/ou brenop.x3@gmail.com

Naomi Souza Rodrigues/celular (61) 9939-76996 e/ou naomi.sr04@gmail.com

Endereço dos(as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição:

Endereço:

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade:

Telefones p/contato: