



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Estabilidade térmica dos compostos biologicamente ativos do colostro

Vanessa Maria Ferreira de Freitas

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professor Doutor Ladislav Curda (ICT, Praga),

coorientado pela Professora Doutora Deborah Power e por Volodymir Skalka,(ICT,
Praga)

2015



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Estabilidade térmica dos compostos biologicamente ativos do colostro

Vanessa Maria Ferreira de Freitas

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professor Doutor Ladislav Curda (ICT, Praga),

coorientado pela Professora Doutora Deborah Power e por Volodymir Skalka, (ICT, Praga)

2015

Estabilidade térmica
dos compostos biologicamente ativos
do colostro

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

Vanessa Freitas

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Copyright © 2015 Universidade do Algarve, Portugal

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Ladislav Curda por me ter possibilitado a oportunidade de colaborar no seu departamento de laticínios, gordura e cosméticos da Faculdade de Alimentos e Tecnologia Bioquímica no Instituto Químico Tecnológico de Praga, República Checa e pela disponibilidade prestada ao longo do Programa Erasmus.

Ao meu co-orientador Volodymyr Skalka por todo o apoio prestado ao longo da minha estadia no departamento de laticínios, gordura e cosméticos no ICT, Praga.

À minha orientadora Professora Doutora Deborah Power, que se mostrou sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida, agradeço a partilha de conhecimentos durante a orientação desta dissertação de mestrado e pelo incentivo que contribuiu de forma decisiva para finalizar este trabalho.

À Ana Raquel Santa Maria pela amizade, ajuda, conselhos e pelo conhecimento de formatação manifesto a minha gratidão.

Aos meus familiares nomeadamente pais, irmãos e avós que dum forma ou outra contribuíram ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os meus amigos um muito obrigada pela sincera amizade e apoio ao longo destes anos na Universidade do Algarve e que se revelaram essenciais para a boa execução desta dissertação.

RESUMO

O colostro bovino, devido ao seu elevado teor de nutrientes tem sido alvo de muitos estudos de forma a saber a estabilidade térmica dos seus constituintes. O objetivo deste estudo foi caracterizar e observar o comportamento das proteínas constituintes do colostro bovino quando submetido a tratamento térmico, e ainda a identificação da temperatura ótima. Os métodos utilizados foram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e o ensaio enzimático da atividade da lactoperoxidase.

Neste estudo, o colostro apresentava 50 g de IgG/L, valor indicador de boa qualidade. O colostro foi armazenado no frigorífico a 4°C e posteriormente submetido às seguintes temperaturas: 55, 60, 65 e 70°C durante uma hora. Ao fim de cada 5 min foram retiradas alíquotas e colocadas em gelo. Seguidamente adicionaram-se a cada amostra para HPLC 1800 µl de solução tampão e 200 µl de colostro bovino aquecido. As amostras foram colocadas numa placa de agitação termoregulada a 9°C durante 15 minutos a 1400 rpm e posteriormente numa centrífuga a 4°C durante 15 min a 1400 rpm. Seguiu-se o processo de filtração prévio à cromatografia líquida de alta eficiência. Já no estudo da atividade da lactoperoxidase, pipetou-se 2,20 mL de solução tampão, 0,70 mL de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) e 0,10 mL de água oxigenada (H₂O₂). Misturou-se por inversão. De seguida adicionaram-se 0,05 mL de solução colostro aquecido. Por fim misturou-se por inversão e registou-se o aumento da absorvância 436 até aproximadamente 2 minutos. Foi possível identificar a IgM, IgA e IgG no colostro através da cromatografia líquida de alta eficiência e verificar que a IgG é cem vezes mais abundante do que as restantes imunoglobulinas. As condições ideais para o tratamento térmico do colostro bovino foram verificadas a uma temperatura de 60°C mantida durante 60 minutos, em que se observou uma redução mínima nos níveis de concentrações IgG e um mínimo de alteração na viscosidade. Relativamente a atividade da lactoperoxidase, confirmou-se a estabilidade térmica até os 70°C durante 1 hora de tratamento.

Palavras-chave: colostro, imunoglobulinas, pasteurização, tratamento térmico, lactoperoxidase

ABSTRACT

Bovine colostrum because of its high nutrient content has been the subject of many studies in order to determine the thermal stability of its constituents. The aim of this study was to characterize and observe the behavior of the constituent proteins from colostrum when subjected to heat treatment and identify the optimal processing conditions. It is also sought to identify the optimum temperature. The methods used were high pressure liquid chromatography (HPLC) and enzymatic determination of lactoperoxidase activity.

Bovine colostrum contains 50 g of IgG/L, and the concentration of this protein is used as an indicator of quality. Colostrum was stored in a refrigerator at 4 ° C and subsequently subjected to the following temperatures: 55, 60, 65 and 70 ° C for one hour. Every 5 minutes after application of the temperature treatment aliquots of colostrum were removed and placed on ice. Subsequently, 1800 µl of buffer solution was added to 200 µl samples of heated bovine colostrum. The samples were placed on a stirring plate at 9 °C for 15 minutes and then centrifugated at 1400 rpm for 15 min at 4 ° C and subsequently filtered to remove solid matter and analysed by HPLC. To determine the lactoperoxidase activity 2.20 mL of buffer, 0.70 of mL of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 0.10 mL of hydrogen peroxide (H₂O₂), were added to (0.05 ml) heat treated colostrums and mixed by inversion. Lactoperoxidase activity in the heat treated colostrums was analysed in a spectrophotometer by monitoring the change in absorbance at 436 nm at 2 minute intervals over 60 minutes.

The optimal conditions for heat treatment that minimized the loss of IgG and lactoperoxidase activity in bovine colostrums were 60 °C for 60 minutes. When bovine colostrum was heated at 60 ° C for 60 minutes there was a minor reduction in IgG concentrations and minimal change in the viscosity. Lactoperoxidase was not a good proxy for monitoring the impact of heat treatment on colostrums as it was much more stable than IgG and heat treatment, 70 ° C for 1 hour treatment did not significantly modify the activity of the enzyme.

Keywords: colostrum, immunoglobulins, pasteurization, heat treatment and lactoperoxidase

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Colostro	13
1.2. Composição do colostro bovino	15
1.2.1. Imunoglobulinas	16
1.2.2. Lactoferrina.....	17
1.2.3. Lactoperoxidase	17
1.2.4. Lisozima.....	18
1.2.5. α -lactalbumina	19
1.2.6. β -lactoglobulina	19
1.3. Comparação dos constituintes do colostro bovino com leite bovino e com colostro humano	20
1.4. Avaliação de redução microbiana.....	21
1.5. O colostro como alimento funcional	22
1.6. Capacidade de cicatrização de feridas	23
1.7. Pasteurização	24
1.8. Efeitos do tratamento térmico no colostro e no leite	25
1.9. Efeitos do pH no leite e no colostro bovino	26
1.10. Objetivos	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Obtenção das amostras de colostro.....	28
2.1.1. Método de colheita das amostras de colostro	28
2.2. Análise das amostras de colostro.....	28
2.2.1. Processo térmico das amostras para HPLC	28
2.2.1.1. Definição dos parâmetros cromatográficos	30

2.2.2. Análise da atividade lactoperoxidase	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1. Efeitos do tratamento térmico na concentração de imunoglobulinas	32
3.2. Análise dos cromatogramas obtidos por HPLC	33
3.3. Análise das áreas obtidas nos cromatogramas após tratamento térmico	38
3.3.1. Estabilidade térmica da IgG.	38
3.3.2. Estabilidade térmica de IgA	41
3.3.3. Estabilidade térmica da IgM.....	43
3.3.4. Comparação da estabilidade térmica das Ig	46
3.4. Estabilidade térmica da lactoperoxidase.....	47
4. CONCLUSÃO	49
5. PERSPETIVAS FUTURAS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AEA	Eficiência de absorção
BSA	Albumina de soro bovino
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fab	Fragmento de ligação do antigénio
Fc	Fração cristalizável
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
HTST	<i>High-temperature short-time</i>
ICT	Instituto Químico Tecnológico
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina alfa
IgM	Imunoglobulina mu
IGF ₁	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF ₂	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IgG	Imunoglobulina gama
IgG ₁	Imunoglobulina gama 1
IgG ₂	Imunoglobulina gama 2
LF	Lactofarina
LP	Lactoperoxidase
OMS	Organização mundial de saúde

RID	<i>Single radial immunodiffusion</i>
SCNK	Tiocianato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF- α	Fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TIA	<i>Turbidimetric immuno assay</i>
UHT	<i>Ultra high temperature</i>
UP	Ultrapasteurização

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição do colostro bovino da primeira, segunda e terceira ordenha e do leite maduro. Adaptado de [3]. 15

Tabela 2. Composição nutricional do colostro humano e bovino. Adaptado de [1] 21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação gráfica da monitorização por HPLC da área correspondente a IgG do colostro bovino, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C, (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min..... 39

Gráfico 2. Representação gráfica da monitorização por HPLC da área correspondente a IgA do colostro bovino, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C, (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min..... 42

Gráfico 3. Representação gráfica da monitorização por HPLC da área correspondente a IgM do colostro bovino, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C, (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min..... 44

Gráfico 4. Atividade da lactoperoxidase a 55°C,60°C,65°C e 70°C. O ensaio enziático realizado segundo Kessey.J., 1987 e Putter, J., 1983, usando ABTS como substrato. ... 47

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da estrutura de um anticorpo, com indicação das cadeias leves e pesadas ligadas por pontes de dissulfeto, respectivas regiões constantes (representadas com cor azul claro) e variáveis (representadas com cor laranja), e locais de de ligação do antigénio. Adaptado de (Butler, 1998) 16
- Figura 2.** Proteínas principais do colostro e leite bovino evidenciando a relação de proporcionalidade de todos os constituintes. Adaptado de (Marnila & Korhonen, 2004) 20
- Figura 3.** Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 55°C passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800µl de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200 µl de colostro bovino. 34
- Figura 4.** Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 60°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800µl de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200µl de colostro bovino. 35
- Figura 5.** Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 65°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 µl de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200µl de colostro bovino. 36
- Figura 6.** Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 70°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 µl de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200µl de colostro bovino. 37

1. INTRODUÇÃO

O estudo do comportamento das proteínas do colostro, mais precisamente do colostro bovino, quando submetido a diferentes temperaturas, tem sido motivo de análise devido ao colostro ser considerado o melhor reforço natural imunológico. Além disso, o colostro tem grande potencial para a indústria farmacêutica, é um excelente nutracêutico, uma mais valia para doenças gastrointestinais e autoimunes e eficaz para o aumento da força e da resistência dos atletas de alta competição [1].

O colostro é o primeiro leite produzido pelas glândulas mamárias no fim da gravidez e nos primeiros dias pós-parto. Esta substância é importante para todos os mamíferos devido ao seu elevado teor de nutrientes e a sua capacidade de fazer a transferência imunológica passiva de Imunoglobulinas (Ig), leucócitos e outros componentes imunológicos. A proteção passiva imunológica é conseguida pela ingestão e absorção de quantidades adequadas de imunoglobulinas até que o sistema imunológico do bezerro se torne completamente funcional. A quantidade de colostro fornecido é um fator que influencia as primeiras horas de vida do recém-nascido e confere proteção contra a exposição às doenças [2]. No entanto, ainda assim, várias doenças, incluindo a doença de Johne's (*Mycobacterium avium ssp paratuberculosis*), podem ser transmitidas através do colostro.

A produção animal é caracterizada por ser uma atividade de grande referência para o desenvolvimento económico, social e ambiental. É importante referir que não se deve agredir os critérios de sustentabilidade e a presença dos recursos naturais. Como objetivo principal, a produção animal tenta aumentar ao máximo a produtividade respeitando sempre a diversidade biológica [3]. Relativamente a alimentação dos bezerros, caso as vacas não possuam um colostro de qualidade 50 g de IgG/L os bezerros devem obrigatoriamente ser separados das mães e a alimentação artificial tem de ser administrada. O objetivo principal deste estudo é a obtenção de um colostro bovino com a maior quantidade possível de nutrientes de forma a poder ser aproveitado para o consumo humano.

No que diz respeito à colheita e armazenamento do colostro para fins de obtenção de suplemento alimentar e para manter o primeiro leite em boas condições é

preciso ter em atenção um conjunto de fatores. Para evitar a proliferação bacteriana várias estratégias são utilizadas, como por exemplo: o congelamento, refrigeração, o uso de conservantes e utilização de garrafas previamente higienizadas com detergente neutro sem a presença de ar. Um outro método usado para reduzir ou eliminar as bactérias é o tratamento térmico no colostro fresco, que será explicado posteriormente [4]. Contudo, pesquisas adicionais devem ser feitas de modo a determinar se os estudos laboratoriais podem ser realizados em grande escala e se a comercialização de sistemas de pasteurização é viável tendo em conta todos os custos envolventes.

A produção animal e o processamento alimentar são temas que podem ser abordados na engenharia biológica. Assim, o processo de isolamento e purificação através da cromatografia de troca iónica, cromatografia de afinidade e cromatografia de interação hidrofóbica do colostro bovino, são métodos que podem ser aplicados e que podem ser promissores para a indústria biotecnológica [5].

1.1. Colostro

O colostro é um fluido amarelado de viscosidade elevada e uma fonte rica em nutrientes e anticorpos necessários para a protecção do recém-nascido contra doenças infecciosas nos primeiros dias de vida. O recém-nascido é alimentado nos primeiros dias de vida por este primeiro leite, seguidamente na segunda semana de vida passa a ser alimentado com leite maduro. O colostro bovino é produzido durante a gravidez, mais especificamente no último trimestre de gestação até alguns dias depois do parto. Caso o colostro queira ser armazenado, este deve ser obtido entre o primeiro e o quinto dia após o parto uma vez que passadas 72 horas os níveis de anticorpos descem consideravelmente [6]. Os componentes que existem em maior quantidade são a IgG, a IgM, a IgA, contudo o colostro também possui péptidos antimicrobianos de elevada importância como por exemplo: a lactoperoxidase e a lactofarina [7].

À nascença, o sistema imunológico dos bezerros não possui capacidade suficiente para produzir anticorpos necessários para a luta contra qualquer infeção [8]. Deste modo, o colostro, sendo a primeira secreção das glândulas mamárias, confere aos bezerros a protecção imunológica necessária para as primeiras semanas de vida [9]. Conferindo não só imunidade passiva como também efeitos no desenvolvimento do intestino do recém nascido desde que o recém-nascido tenha: fatores de crescimento,

citocinas, nucleótidos, poliaminas, enzimas, lactoferina, lisozimas, insulinas, IGF 1 e IGF 2 (Tabela 1) [10]. Outra importância do colostro foi verificada na circunferência, área, altura e profundidade das vilosidades do duodeno, uma vez a que estas eram maiores nos bezerros que tinham sido alimentados com colostro e por consequência havia melhorias a nível da capacidade de absorção nos animais alimentados com colostro [10].

O primeiro leite contém proteínas, aminoácidos essenciais e não essenciais, ácidos gordos, lactose, vitaminas e minerais (Tabela 1). Exceptuando a lactose, o colostro contém uma concentração de nutrientes, níveis energéticos, proteicos e de minerais mais elevada do que o leite maduro [11]. Esta substância pode também ajudar a reconstituir o sistema imune, enquanto favorece o crescimento celular e a reparação de tecidos. Além disso, é um alimento que protege e promove a saúde. Por este motivo, as empresas biotecnológicas estão trabalhando para clonar e reproduzir grandes quantidades dos principais compostos presentes no colostro [1].

Durante a formação do colostro dá-se a transferência de Igs maternas presentes no sangue para o colostro que vai ser formado nas glândulas mamárias com a finalidade de alimentar o recém-nascido. A produção do colostro pelas glândulas mamárias começa várias semanas antes do parto e continua até o momento do nascimento, altura em que a sua produção começa logo a diminuir sendo depois substituída pelo leite maduro. Os níveis elevados de estrogénio e os níveis baixos de progesterona coincidem com a transferência de IgG através dos recetores das células mamárias. A prolactina faz diminuir a regulação recetiva de IgG responsável pela transferência de Ig da mãe para o epitélio mamário [12].

Na produção animal, o período seco, isto é, o período de descanso, a nutrição, a raça e o programa de vacinação são alguns dos fatores que influenciam a produção do colostro. Foi comprovado que a diminuição da duração do período seco dos tradicionais 55 dias para 34 dias não alterava a concentração de Ig. Mas caso o período seco fosse omitido na sua totalidade diminuía numa forma rápida a concentração de Ig do colostro bovino. Foi também confirmado que a vacinação iria aumentar a concentração de Ig no colostro contra agentes patogénicos específicos [4].

1.2. Composição do colostro bovino

O primeiro leite, tem um total de sólidos de 23,9 %. Na primeira ordenha possui 6,7% de lípidos e 14,9% de proteínas. Estes valores caem para 4,0% e 3,1%, respetivamente, no sexto dia. A energia fornecida do colostro através da gordura é importante para a termoregulação e para a gliconeogénese do recém-nascido. O elevado nível de proteínas, de Ig, caseína, albumina e outras proteínas nutricionais que fornecem aminoácidos para o bezerro são fundamentais para o começo da síntese proteica e a homeostase [4]. Existem diversos estudos sobre a composição do colostro bovino, esta vai variando a sua composição ao longo da sua produção. A composição do colostro logo após o parto (1), numa segunda fase ou segunda ordenha(2) isto é, 24h após parto e a terceira ordenha (3) 72h após parto encontra-se apresentada na Tabela 1 assim como a composição do leite maduro.

Tabela 1. Composição do colostro bovino da primeira, segunda e terceira ordenha e do leite maduro. Adaptado de [10].

Nutrient or compound	Colostrum milking			Mature milk
	1	2	3	
Dry matter, g/L	245.00	190.00	160.00	122.00
Crude ash, g/L	18.00	10.00	10.00	7.00
Gross energy, MJ/L	6.00	4.80	3.90	2.80
Crude fat, g/L	64.00	56.00	46.00	39.00
Crude protein, g/L	133.00	85.00	62.00	32.00
Solids-non-fat, g/L	167.00	122.00	98.00	88.00
Casein, g/L	48.00	43.00	38.00	25.00
Lactose, g/L	27.00	39.00	44.00	50.00
Ash, g/L	11.10	9.50	8.70	7.40
Immunoglobulins, g/L	81.00	58.00	17.00	< 2.00
Lactoferrin, g/L	1.84	0.86	0.46	ND
Trasferrin, g/L	0.55	0.44	0.39	ND
γ -Glutamyltransferase, μ kat/L ¹	509.00	284.00	145.00	52.00
TNF- α , μ g/L	5.00	ND	ND	< 2.00
Insulin, μ g/L	65.00	35.00	16.00	1.00
Glucagon, μ g/L	0.16	0.08	0.08	0.01
Prolactin, μ g/L	280.00	180.00	150.00	15.00
Growth hormone, μ g/L	1.40	0.50	< 1.00	< 1.00
IGF-I, μ g/L	310.00	195.00	105.00	< 2.00
IGF-II, μ g/L	150.00	ND	ND	ND
Retinol, μ g/g	4.90	-	-	0.37
Tocopherol, μ g/g	2.92	-	-	0.28
β -Carotene, μ g/g	0.68	-	-	0.27
Thiamin, μ g/mL	0.90	-	-	0.45
Riboflavin, μ g/mL	4.55	-	-	1.75
Niacin, μ g/mL	0.34	-	-	0.90
Vitamin B ₁₂ , μ g/mL	0.60	-	-	0.01
Ca, mg/kg	4,716.10	-	-	1,300.00
Mg, mg/kg	733.24	-	-	100.00
Na, mg/kg	1,058.93	-	-	400.00
K, mg/kg	2,845.89	-	-	1,500.00
Zn, mg/kg	38.10	-	-	3.50
Fe, mg/kg	5.33	-	-	0.75
Cu, mg/kg	0.34	-	-	0.10
Mn, mg/kg	0.10	-	-	0.01

¹ μ Kat/L = microkatal/L.

Na Tabela 1 observa-se a descida da quantidade de nutrientes do colostro da primeira ordenha até a terceira. Também é possível verificar que o leite maduro possui menor quantidade de nutrientes, excetuando a lactose ($50 \mu\text{Kat/L}$) quando comparado com os valores para o colostro bovino. A riqueza em nutrientes, imunoglobulinas, fatores de crescimento no colostro bovino relativamente ao leite maduro evidencia o potencial do colostro.

1.2.1. Imunoglobulinas

O colostro contém grandes quantidades de imunoglobulinas (Ig) que são transferidas através da mãe para os seus descendentes [13][14]. Este transporte é feito a partir das glândulas mamárias, que começa semanas antes do parto e atinge o pico máximo no terceiro dia após o parto [15].

Existem três grandes tipos de imunoglobulinas no colostro bovino: IgG, IgM e IgA. A quantidade de IgG, IgM e IgA no colostro bovino são de 85%, 5% e 7% respetivamente [13]. A IgG consegue atravessar a placenta e possui elevada capacidade de ligação para o antígeno. A IgM é uma molécula pentamérica que funciona como o recetor para o antígeno e que se encontra a nível intravascular e a IgA é uma estrutura monomérica de quatro cadeias básicas que fornece imunidade local sendo secretada nas mucosas [16].

Os vários tipos de imunoglobulinas têm funções importantes a nível fisiológico, mas a quantidade predominante de IgG faz com que este tipo de imunoglobulinas seja um indicador adequado para a transferência de imunidade passiva [17]. A IgG pode por sua vez, ser dividida em duas subclasses nos bovinos: IgG_1 e IgG_2 [14] estando o ponto isoeletrico da IgG_1 entre 5.5 e 6.8 e da IgG_2 entre 7.5 e 8.3. É importante referir que a IgG_1 está presente em 90% da IgG total [18].

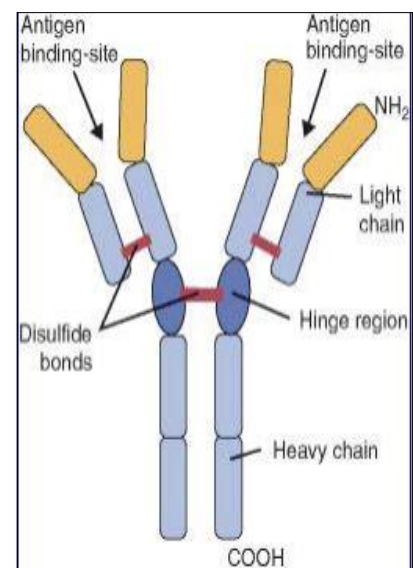


Figura 1. Representação da estrutura de um anticorpo, com indicação das cadeias leves e pesadas ligadas por pontes de dissulfeto, respetivas regiões constantes (representadas com cor azul claro) e variáveis (representadas com cor laranja), e locais de de ligação do antígeno. Adaptado de (Butler, 1998)

Caso o colostro bovino tivesse baixos níveis de IgG, haveria uma redução na eficiência da função do colostro, mais especificamente na imunidade passiva. As vacas que possuíssem um colostro com níveis reduzidos de IgG, faziam aumentar a probabilidade de desenvolver pneumonia nos bezerros recém-nascidos. Caso a concentração de proteína total fosse inferior a 50g/L estariam os vitelos mais susceptíveis à morte [19][20]. Assim, níveis adequados de imunoglobulinas nos bezerros, são capazes de desativar numa fase precoce a invasão de patógenos e estimulavam o seu crescimento [21].

1.2.2. Lactoferrina

É uma glicoproteína de ligação de ferro com propriedades antibacterianas e antivirais. O seu peso molecular é de 80 kDa. Esta proteína consegue manter o ferro ligado a um pH baixo. A concentração de lactoferrina (Lf) no colostro bovino é de 1,5-5 mg/mL [18]. Tem um papel fundamental não apenas contra microorganismos, mas também contra respostas imunitárias excessivas prejudiciais ao hospedeiro [22]. A Lf é considerada como a primeira linha de defesa contra várias infeções microbianas podendo ser bactericida ou bacteriostática devido ao sequestro de ferro no local da inflamação. Outros efeitos da Lf incluem atividade anti-viral, anti-parasita e antifúngica [22]. Também possui atividade indireta, na prevenção da invasão do microrganismo, bloqueando a sua interação com os recetores utilizados para a entrada na célula hospedeira [23]. Em relação ao pH e à estabilidade térmica, a lactoferrina é muito estável entre pH 4,0 e 7 e a temperaturas elevadas (90 e 100 ° C) durante 5 minutos. A lactoferrina tratada a um pH de 2,0 ou 3,0 e a 100 ou a 120°C durante 5 min foi aparentemente degradada, sendo o ponto isoeléctrico a pH 8 [24].

1.2.3. Lactoperoxidase

Faz parte da família das peroxidases. Esta enzima é uma oxidoredutase segregada a partir do leite e tem um papel importante na proteção da glândula mamária e no trato intestinal do recém-nascidos contra microorganismos patogénicos [25]. As reacções de lactoperoxidase no chamado sistema lactoperoxidase são inofensivas para as células dos mamíferos [26]. Este sistema consiste em três componentes: lactoperoxidase, tiocianato e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e só é ativado na presença simultânea de todos eles. A lactoperoxidase catalisa a oxidação de tiocianato (SCNK)

por peróxido de hidrogénio e gera produtos intermédios com propriedades antibacterianas. Estes produtos têm efeitos antimicrobianos contra bactérias, fungos e vírus. Esta glicoproteína tem um peso molecular de aproximadamente 78 kDa. A concentração da lactoperoxidase no colostro de vaca tem cerca de 30 mg/L, que é a mesma presente no leite maduro. A sua destruição tem sido utilizada como um índice de eficiência de pasteurização de leite. A desnaturação pelo calor de lactoperoxidase começa a partir dos 70 °C [27]. A lactoperoxidase é menos estável ao calor sob condições ácidas, possivelmente devido à libertação de cálcio a partir da molécula inicial. A lactoperoxidase é desativada por armazenamento a pH 3 e a sua desnaturação foi observada a valores de pH 4. Valores de pH até 10 parecem não desativar a lactoperoxidase à temperatura ambiente. O pH ótimo da reação catalisada por lactoperoxidase foi estudado através do ácido 2,2-azino bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) como substrato e encontra-se entre pH 5 e 6, dependendo das concentrações de ABTS e H₂O₂. O seu ponto isoelétrico é a pH 9,6. A lactoperoxidase é relativamente estável a enzimas proteolíticas; no entanto, parece ser muito sensível à luz, na presença de riboflavina, composto orgânico das vitaminas [28].

1.2.4. Liozima

A liozima é chamada de N-acetylmuramidase ou muramidase. É uma enzima do tipo hidrólise que catalisa a degradação de polímeros do peptidoglicano da parede celular bacteriana na ligação β -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, assim consegue lisar as bactérias mais sensíveis. A massa molecular é de 14 307 Da. A liozima parece inibir não só as bactérias onde a camada de peptidoglicano é um componente importante da sua parede celular, mas também a vírus e microrganismos eucarióticos de uma camada de peptidoglicano, sugerindo uma atuação por outros mecanismos de ação do que a atividade hidrolítica; o mais provável é que a interação seja feita com a camada lipídica da membrana interna. A nível prático, a liozima tem aplicação na conservação de alimentos, como por exemplo a clara de ovo já é utilizada com sucesso como um antimicrobiano em muitos alimentos, especialmente em queijos e teve avaliações positivas na agências reguladoras internacionais, como a OMS [29]. A concentração de liozima no colostro bovino é entre 0,3 e 0,8 mg/L, uma diminuição de 0,1 mg/L é verificada no leite maduro. A liozima tem uma atividade ótima entre 40 e 45 °C, mas permanece ativa até os 62 °C.

Se a lisozima for adicionada a temperaturas mais baixas, a taxa de atividade vai abrandar drasticamente. A atividade de lisozima é mais elevada a partir de um pH de 3,5 a 7,0, embora a lisozima seja ativada ao longo de um intervalo de pH 2,0-10,0. O ponto isoelétrico é a pH 11,35 [30].

1.2.5. α -lactalbumina

É uma proteína que está presente no leite de todos os mamíferos. É um componente do complexo da síntese de lactose na glândula mamária e está, por conseguinte, presente em concentrações relativamente elevadas no leite de espécies com alta concentração de lactose, incluindo o leite humano. O leite bovino contém menos de α -lactalbumina, mas frações de proteínas humanas enriquecidas com α -lactalbumina pode agora ser adicionada à fórmula para lactentes de forma a proporcionar alguns dos benefícios de α -lactalbumina humano. Pesquisas recentes sugerem que α -lactalbumina pode exercer propriedades antibacterianas e imunoestimulantes, devido aos péptidos envolvidos na digestão e, possivelmente, por ter um papel na apoptose. O seu ponto isoelétrico esta entre pH 4,2 e 4,6 e é altamente solúvel em soluções de água e sal. Quando está exposta a pH baixo, tal como iria ocorrer no estômago, α -lactalbumina pode ser transformada no que é chamado um estado "glóbulo fundido". Esta estrutura é um intermediário entre o estado nativo e no estado completamente desnaturado, e é provável que seja importante para a digestão proteolítica de α -lactalbumina. Outras condições podem também transformar a proteína no seu estado de glóbulo fundido, tal como um pH alcalino, o tratamento com calor moderado ou a adição de iões metálicos, tais como o zinco. O peso molecular é de 14 178 Da [31]. Concentração de α -lactalbumina no colostro bovino é de 2 g/L [32].

1.2.6. β -lactoglobulina

É a principal proteína de soro do leite de ruminantes e também está presente no leite de outras espécies. Pertence à família das proteínas lipocalinas, que envolve uma função de ligação do ligando e tem-se especulado que uma função semelhante deve ser a razão fisiológica para as quantidades significativas de β -lactoglobulina encontrados no leite. A β -lactoglobulina é uma pequena proteína, solúvel em solução salina diluída,

como convém numa globulina, com peso molecular de cerca de 18 400 Da [33]. O ponto isoeléctrico é pH 5,1. Sendo a concentração no colostro bovino de 8 g/L [32].

1.3. Comparação dos constituintes do colostro bovino com leite bovino e com colostro humano

O colostro bovino comparativamente ao leite bovino apresenta diferenças na sua constituição como se pode verificar na Figura 1 e e na Tabela 1. Os principais constituintes do colostro bovino, como já antes mencionado, são as imunoglobulinas (75%). Seguidamente, numa percentagem menor, encontra-se a caseína, depois a β -lactoglobulina, α -lactalbumina e por fim a lactoferrina. Já no leite bovino, a percentagem dos constituintes, muda drasticamente, uma vez que as imunoglobulinas tornam-se quase inexistentes, sendo a caseína o constituinte presente em maior percentagem (~80%).

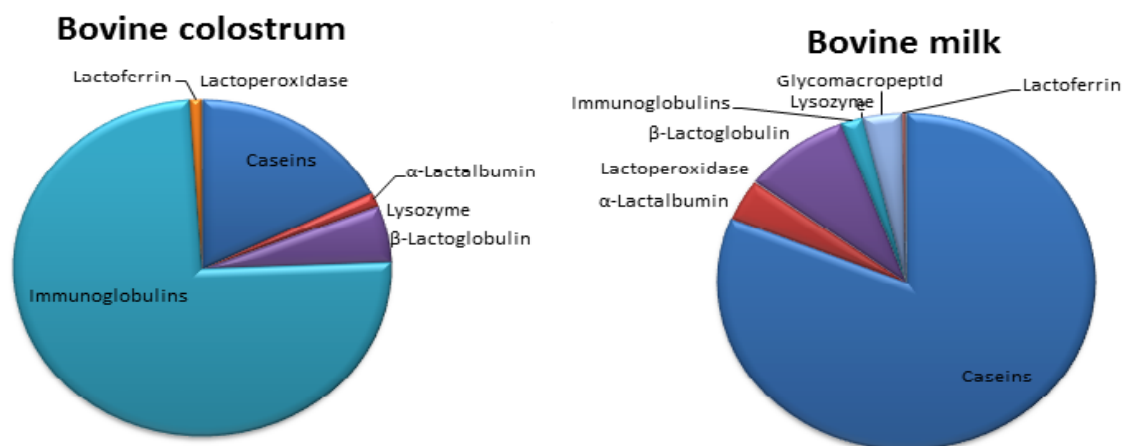


Figura 2. Proteínas principais do colostro e leite bovino evidenciando a relação de proporcionalidade de todos os constituintes. Adaptado de [32].

É importante ter noção que existem também diferenças a nível nutricional e imunológico relativamente ao colostro humano e ao colostro bovino. Estas diferenças podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição nutricional do colostro humano e bovino. Adaptado de [1]

Nutritional factor	Human Colostrum	Bovine Colostrum
Energy(kcal)	58	~130
Protein(g)	3.7	~14.9
lactose(g)	5.3	~2.6
Fat(g)	2.9	~6.7
*per 100ml of colostrum		

Na Tabela 2, verifica-se que a percentagem mais elevada dos fatores nutricionais encontra-se no colostro bovino, esta é uma das razões pela qual as investigações são sempre efetuadas no colostro bovino e não no colostro humano. Outra explicação para os investigadores optarem sempre pelo colostro bovino é devido a facilidade na sua obtenção e ao custo reduzido.

Relativamente as imunoglobulinas predominantes é importante referir que a IgA é a imunoglobulina presente em maior quantidade no colostro humano.

1.4. Avaliação de redução microbiana

Nos últimos anos, tem havido uma maior preocupação com a contagem microbiana do colostro. A contaminação microbiana pode ocorrer pela secreção a partir das glândulas mamárias, pela contaminação das glândulas mamárias e do úbere, pela contaminação do equipamento de ordenha ou por recipientes de armazenamento contaminados. Os contaminantes no colostro inclui: as bactérias de pele bovina, contaminantes ambientais ou fecais. Um exemplo de microrganismos que podem ser encontrados no colostro, por secreção ou por contaminação durante a ordenha ou pelo processo de armazenamento são: *Mycobacterium avium. paratuberculosis*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *streptococcus spp.*, *M. paratuberculosis* e vírus da leucemia bovina [34].

A colheita do colostro logo após o parto é uma estratégia que evita infeções intramamárias. A limpeza da tetina final é essencial para minimizar a contaminação microbiana do colostro. Após a colheita, é necessário saber onde vai ser armazenado o primeiro leite e qual o equipamento que vai ser utilizado de forma a evitar fontes de

contaminação bacteriana. Os locais de armazenamento e os equipamentos utilizados devem estar em perfeitas condições de assepsia. Uma outra possível causa de contaminação encontra-se nas temperaturas usadas para o armazenamento, se for à temperatura ambiente, com ou sem conservantes, ou com refrigeração. A maior redução microbiana verificou-se quando o colostro foi refrigerado com conservante. Contudo o congelamento do colostro é considerada a melhor opção para preservar o conteúdo nutricional [35].

1.5. O colostro como alimento funcional

O colostro bovino é considerado um excelente suplemento nutricional especialmente para os idosos, que precisam de neutralizar os efeitos imuno-supressores do stress, doença e muita comida "preparada" consumida na dieta alimentar [36]. O colostro hiperimune ou leite preparado destinado a grupos de consumidores específicos podem desempenhar um papel importante na área da saúde, uma vez que é possível promover uma dieta com base nestes produtos e usar como alternativa ou complemento para regimes de tratamentos médicos. A Ig no colostro bovino pode ser usada como suplemento imunológico para crianças e outros alimentos hiperimunes. Um suplemento alimentar contendo colostro bovino processado, peróxido de magnésio (como fonte de oxigénio activo), uma vitamina (por exemplo, vitamina C) e succinato de magnésio pode ser uma excelente ideia para um alimento funcional. Hoje em dia, é possível encontrar uma grande variedade de suplementos em forma de comprimido ou cápsula, apresentando as vantagens de colostro, oxigénio ativo e outros ingredientes benéficos para a saúde humana. As aplicações dos produtos obtidos a partir do colostro bovino em nutrição clínica humana foram analisadas e o sucesso conseguido no tratamento e prevenção de infeções do trato digestivo em crianças foi confirmado. Foi demonstrado que a ingestão de Ig tinha atividade neutralizante contra o rotavirus impedindo a ocorrência de diarreia. Assim, as Ig presentes no colostro bovino podem ser utilizadas como suplemento imunológico e outros alimentos hiperimunes para as crianças [2].

1.6. Capacidade de cicatrização de feridas

Além de proporcionar excelente suporte imunológico, o colostro tem influência na reparação e crescimento muscular-esquelético. Estudos revelaram que o colostro é a única fonte natural de dois principais fatores de crescimento, ou seja, os fatores de crescimento transformador alfa e beta e a insulina como fatores de crescimento (IGF-1 e IGF-2) [37]. Estes fatores de crescimento têm capacidade de reparação muscular e de cartilagem bioquimicamente excelentes. Promovem a cicatrização de feridas e possuem excelentes implicações para trauma e cura cirúrgica. A TGF- α e TGF- β estão envolvidos em atividades celulares, tais como desenvolvimento embrionário, a proliferação celular e a reparação de tecidos. IGF-1 ajuda na cicatrização de feridas, pode retardar o catabolismo e é o único fator de crescimento que pode estimular o crescimento muscular e reparar por si só. O seu papel na diferenciação, reparação e de síntese, bem como a sua interação com outros fatores de crescimento necessários, resulta em efeitos regenerativos em quase todas as células estruturais do corpo humano [2].

O colostro bovino apresenta um custo reduzido, a sua produção existe em grande volume, o processamento do colostro é semelhante ao do leite, isto é, o sistema de recolha do leite pode ser adoptado para a recolha do colostro. Relativamente a engenharia genética, existe a possibilidade de criar um recombinante, a partir de uma proteína de interesse. As técnicas do DNA recombinante têm sido utilizadas no melhoramento genético de animais para que produzam maior quantidade de leite e para que desenvolvam maior massa corporal para produção de carne. Como exemplo, o gene para a hormona de crescimento foi isolado das vacas e clonado em *Escherichia coli*. Estas bactérias produzem grandes quantidades de hormona do crescimento bovino, que administrado ao gado leiteiro aumenta a produção de leite. Além disso, outros animais geneticamente modificados estão sendo desenvolvidos para levar genes codificadores de produtos farmacêuticos [38].

Hoje em dia, o uso do colostro bovino já está a ser explorado na indústria farmacêutica. Vários produtos comerciais já foram fabricados e estão disponíveis no mercado. Como por exemplo:

- a) Gastrogard, um produto utilizado para evitar a diarreia causada por rotavírus em crianças fabricado do laboratório Northfield na Austrália.
- b) PRO-imune, um produto utilizado nos bezerros para evitar diarreia causadas por *E. Coli*, fabricado em GalaGen, nos EUA.
- c) Bioenervi, um produto a base de colostro para proporcionar crescimento durante a atividade física, por exemplo, na formação de atleta, fabricado no laboratório Bio Products na Finlândia.

1.7. Pasteurização

A pasteurização é um processo obrigatório na indústria de laticínios. Assim não deve ser desprezado pelas indústrias interessadas em explorar o uso do colostro para a fabricação de por exemplo: nutracêuticos. Existem também diversos estudos em curso que pretendem avaliar a melhor maneira de conservar o valor nutritivo do colostro. A pasteurização é uma delas. Este é um processo de aquecimento que destrói microrganismos patogénicos. Esta tecnologia evita a transmissão de doenças, reduz a carga bacteriana do leite, elimina bactérias indesejadas e prolonga a vida do leite e dos seus derivados. Contudo pode eliminar bactérias benéficas e alterar o sabor do leite [39]. A pasteurização devia diminuir o número de microrganismos sobreviventes excepto aqueles resistentes ao calor como por exemplo *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*. Também devia atrasar ou parar a decomposição de alimentos assegurando ao produto um bom prazo de validade sem pôr em risco a sua qualidade [40]. Tratamentos com elevadas temperaturas são os métodos de preservação mais utilizados na indústria alimentar. As temperaturas geralmente usadas estão abaixo do ponto de ebulição da água. Os processos de pasteurização podem ser divididos de acordo com a temperatura e o tempo aplicado. Existem vários métodos entre os quais: o HTST a 72°C durante 15 segundos, a pasteurização lenta a 62°C durante 30 min e a pasteurização muito rápida (UHT) quando a temperatura vai de 130°C a 150°C durante três a cinco segundos antes do processo de empacotamento. A diferença encontrada no uso de HTST e UHT está no prazo de validade sendo maior no UHT de 6-9 meses [41].

UP é um processo semelhante ao HTST mudando apenas o equipamento. No momento de fazer a escolha do método mais apropriado é necessário verificar o teor de gordura existente no produto de forma a escolher o tratamento mais eficaz [42]. Ainda assim, o maior desafio para a adoção de tratamentos térmicos de pasteurização é a dificuldade da aplicação de calor suficiente para todas as superfícies do alimento durante o tempo suficiente de forma a causar uma redução significativa no número de microrganismos sem cozinhar a superfície do alimento [43].

1.8. Efeitos do tratamento térmico no colostro e no leite

O estudo do processo de aquecimento do colostro começou em 1923, tinha como objetivo descobrir o tempo e a temperatura necessária para desativar os organismos de tuberculose sem espessamento do colostro. Deste estudo concluiu-se que o colostro podia ser tratado a 60°C até três horas para desativar a bactéria da tuberculose e para evitar que o produto aumentasse a sua viscosidade [44]. Já em 2000, outro estudo usou 20 bezerros e duas diferentes temperaturas, 76°C e 63°C e comparou o efeito na concentração de Igs após 24 horas. Quando se recorreu a temperatura mais elevada (76°C) verificou-se que *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* era resistente a altas temperaturas. Esta temperatura era geralmente utilizada para a pasteurização. Os bezerros que foram submetidos a essa temperatura tiveram níveis mais baixos de Ig no colostro relativamente aos vitelos que receberam tratamento térmico colostro a 63°C [45]. Por fim em 2003, o colostro foi aquecido à 63°C durante 30 minutos para estudar os efeitos de pasteurização no colostro e a transferência passiva de Ig do colostro para o bezerro. Os autores verificaram uma perda média de 26,2% nas Igs do colostro devido ao processo de tratamento térmico. A percentagem de perda de Ig no colostro foi aparentemente mais elevada em lotes maiores, 95 L, do que quando usados pequenos lotes de 57 L. Relativamente à transferência passiva, verificou-se uma diminuição nos níveis de Ig transferidos passivamente em bezerros alimentados com colostro tratado termicamente comparado com aqueles alimentados com colostro não aquecido [35].

As imunoglobulinas quando submetidas a temperaturas de 75 °C podem reduzir as concentrações de IgG em 40% em 5 min, e em 100% a 95 °C durante 15s [46]. A

exposição ao calor provoca alterações conformacionais na molécula de IgG. A atividade de ligação ao antígeno de IgG de bovino também é reduzida após tratamento térmico. Isto coincide com estudos que sugerem que a região de ligação ao antígeno da molécula de imunoglobulina é mais termolábil do que as outras regiões da molécula [47]. As IgG detetáveis no colostro ou no soro colostrado também são reduzidas por tratamento térmico, no entanto, a uma taxa mais lenta do que para IgG isoladas. Protetores térmicos tais como açúcares ou glicerol podem aumentar a estabilidade da IgG isolada a tratamento térmico [46]. Os campos eléctricos pulsados a alta tensão têm sido usados como método de tratamento não térmico de pasteurização em vários alimentos, não havendo alteração na estrutura secundária ou na estabilidade térmica da estrutura secundária do IgG nem na atividade de ligação ao antígeno [48].

O tratamento térmico do leite e do colostro é um método utilizado para reduzir a carga microbiana e, assim, proporcionar um produto mais higiénico, preservando os componentes nutricionais imunológicos. O tratamento térmico do leite é relativamente simples quando comparado com o do colostro. Sabe-se que as Igs do colostro são cruciais para o bezerro recém-nascido, assim qualquer tratamento não deve reduzir significativamente as propriedades imunológicas do colostro. A recolha e armazenamento de colostro de vacas logo após o parto tem sido um procedimento frequente e eficaz. O colostro armazenado é utilizado para alimentar bezerros recém-nascidos de forma a garantir a absorção adequada de IgG para a protecção do bezerro.

1.9. Efeitos do pH no leite e no colostro bovino

Inicialmente durante o processo de lactação o pH das secreções mamárias bovinas são de 6,4, de seguida, ocorre um aumento ao longo de vários dias para um pH de 6,6-6,9. Este pH é característico do leite maduro. Desta forma, o colostro bovino é ligeiramente mais ácido do que o leite maduro. Estudos da estabilidade das Igs isoladas durante um intervalo de pH indicaram que a IgG isolada a partir do leite bovino é estável durante várias horas a 37 ° C quando o pH estava entre 6-7, no entanto a estabilidade é significativamente reduzida a $\text{pH} \leq 3$ e $\text{pH} \geq 10$. O efeito negativo do pH na estabilidade de IgG, mesmo na gama de 4,5-6,5, é aumentada em condições de temperatura elevada. Uma boa alternativa para o colostro bovino não sofrer grande

alteração fase aos pH utilizados e de forma a garantir a elevada concentração de IgG, seria a utilização de uma emulsão múltipla para encapsular IgG do leite de forma a aumentar a estabilidade da proteína contra condições ácidas ou alcalinas extremas, assim como contra a degradação proteolítica [49].

1.10. Objetivos

O estudo da estabilidade térmica dos constituintes do colostro bovino, têm vindo a aumentar devido ao elevado teor de nutrientes que representa uma mais valia para a melhorar a saúde dos seres humanos através da criação de alimentos funcionais. O tratamento térmico permite reduzir microrganismos patogénicos mantendo os níveis de Ig. Neste estudo pretendemos avaliar o comportamento das Ig quando submetidas a tratamento térmico por HPLC em fase reversa e a atividade da lactoperoxidase através de um ensaio enzimático. De forma a concretizar este estudo pretendeu-se analisar a estabilidade térmica das IgG, IgA e IgM, determinar a atividade da lactoperoxidase quando o colostro foi submetido a 55,60,56 e 70 °C ao longo de uma hora e por fim explorar as possíveis aplicações na Engenharia Biológica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras de colostro

A amostra do colostro bovino foi obtida do Zemědělské družstvo Kojčice (República Checa). Nesta fazenda ocorrem aproximadamente três partos por semana e duas ordenhas diárias aumentando desta forma a disponibilidade de colostro para análise. A vaca imediatamente após o parto foi separada do bezerro recém-nascidos e encaminhada para a sala da ordenha onde se realizou a colheita, nunca ultrapassando doze horas depois do parto.

2.1.1. Método de colheita das amostras de colostro

Para colher a amostra, procedeu-se a limpeza e desinfecção das glândulas mamárias, com uso de água e hipoclorito, secagem e desinfecção dos orifícios do glândulas mamárias com etanol a 70%. Colheu-se 50 mL de colostro puro em um tubo de Falcon de 50 mL. Este procedimento foi efetuado em Zemědělské družstvo Kojčice (República Checa) pelo ordenhador. A amostra foi transportada até o laboratório do Departamento de Lacticínios, Gordura e Cosmética do ICT, Praga, República Checa a 4°C, em caixa de material isotérmico imersa em gelo pelo meu co-orientador Volodymir Skalka.

2.2. Análise das amostras de colostro

2.2.1. Processo térmico das amostras para HPLC

Foram preparadas um total de 48 amostras para análise por HPLC, estas amostras possuem colostro líquido de apenas um único bovino. Numa primeira fase, estas foram aquecidas (Heatsensor-DUO APP032, Unisensor S.A., Liège, Belgium) a 55°C (12 amostras), 60°C (12 amostras), 65°C (12 amostras) e 70°C (12 amostras) durante 5 em 5 minutos até uma hora. Seguidamente as amostras foram colocadas em gelo e carregadas com 1800 ul de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de

acetato de sódio tihidratado) e 200 µl de colostro bovino. Posteriormente, as amostras foram inseridas numa placa de agitação termoregulada (Eppendorf thermomixer, thermomixer comfort, Maneko, Praga, República Checa) a 9°C durante 15 minutos a 1400 rpm e levou-se a cabo o processo de centrifugação (Hettich Universal 320R, Tuttlingen, Alemanha) a 4°C durante 15 min a 1400 rpm. Por fim realizou-se o processo de filtração com o uso de seringas de 3mL, processo prévio à introdução das amostras no HPLC. A coluna utilizada para efetuar o processo cromatográfico foi BioSep-SEC-s2000, 300x7.80mm, Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD. As características do equipamento de HPLC foram: Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) composto por um compartimento para a coluna termostato Agilent 1100, amostrador automático com arrefecimento Agilent 1100, um sistema de entrega de solvente com desgaseificador Agilent 1100, o software utilizado foi o Agilent ChemStation e um sistema detetor Spectra UV 2000 Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA (Anexo A1).

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) é um dos métodos de separação mais utilizados hoje em dia. É baseada na interação entre os analitos, uma fase estacionária sólida e a fase móvel líquida. Ao escolher a fase móvel e a fase estacionária química, os analitos podem ser separados com base em hidrofobicidade, tamanho, carga, e muitas outras propriedades. O sistema de separação inclui três componentes principais: bombas de conduzir a fase móvel, uma coluna, que contém a fase estacionária e um detetor. Para iniciar uma separação, a amostra é primeiro injetada para a coluna utilizando uma válvula de injeção. Após a amostra ter sido carregada, a bomba é usada para atravessar a coluna e conduzir a fase móvel. As várias moléculas da amostra são então separadas e quantificadas com base nas suas propriedades de retenção. À medida que os componentes da amostra vão eluindo para fora da coluna, o detetor mede a concentração. A tendência em HPLC tem sido no sentido de recorrer ao uso de colunas de menor diâmetro, menor taxa de fluxo e tamanhos de grânulos menores. Esta diminuição na escala trouxe consigo várias vantagens, incluindo uma melhoria na resolução e na sensibilidade [50]. A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais reduzidos e reproduzíveis e a deteção de quantidades de analitos cada vez menores em sistemas de deteção em fluxo, que indicam quando os

componentes sofrem eluição da coluna [51]. Assim, apresenta várias vantagens, pois permite automatizar o sistema, reduzir o tempo de análise, efetuar análises qualitativas e quantitativas, bem como ter reprodutibilidade de dados. As desvantagens são o fato do equipamento e a sua manutenção serem dispendiosos, ser um sistema complexo, de apresentar baixa sensibilidade perante alguns compostos e de ser dependente da experiência do operador [52].

Este processo cromatográfico utiliza uma fase móvel, esta fase é um líquido que está a ser continuamente bombeado para a coluna e que atua, não só como transportador da amostra, mas desempenha, igualmente, um papel importante no grau de separação que é possível atingir com uma determinada coluna. É a interação química entre a fase móvel e a amostra com o enchimento da coluna que determina o grau de migração e separação dos componentes contidos na amostra. Assim, o tipo e a composição da fase móvel influencia o grau de separação das espécies químicas numa dada coluna [53]. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia de fase normal. Na situação inversa, ou seja, quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, a cromatografia recebe a denominação de cromatografia de fase reversa. Os adsorventes mais utilizados na cromatografia de fase normal são a sílica e a alumina, enquanto que para a fase reversa são empregues substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino ou apolares [54].

Por fim, na análise por HPLC foi visto que a área do pico em função da concentração tinha um bom relacionamento linear, sendo a área do pico utilizada para a quantificação de proteínas existentes no colostro neste estudo [55].

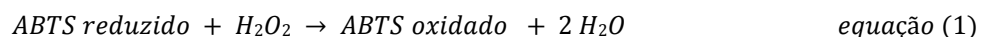
2.2.1.1. Definição dos parâmetros cromatográficos

Relativamente as condições cromatográficas, a fase móvel utilizada foi tampão fosfato (0,2 M) com sulfato de sódio (0,1 M, pH 6,0). O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min. O volume injetado de amostra na coluna foi de 25 µL e as proteínas foram detetadas a 280 nm pelo detetor de UV. O tempo para eluição da amostra foi de 60 min e utilizou-se tampão de fosfato 0,2 M com sulfato de sódio 0,1 M, pH 6,0.

2.2.2. Análise da atividade lactoperoxidase

Para a realização do ensaio enzimático da atividade da lactoperoxidase utilizou-se ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS) como substrato. Este substrato de peroxidase é usado para observar a cinética de reação de enzimas específicas e em procedimentos de ELISA. Permite que a cinética da reação das peroxidases sejam seguidas. Deste modo, também pode ser utilizado para seguir a cinética da reação indiretamente de qualquer enzima produtora de peróxido de hidrogénio, ou simplesmente para quantificar a quantidade de peróxido de hidrogénio presente em uma amostra. Produz um produto final que é solúvel na cor verde e pode ser lido espectrofotometricamente [56]. Assim através da taxa de determinação contínua espectrofotométrica foi possível determinar e caracterizar, de acordo com o método de Kessey, J., 1987 e Putter, J., 1983, a atividade da lactoperoxidase.

Este método baseia-se na catálise de reações de peroxidação lipídica, em que o H_2O_2 é reduzido e um doador de electrões adequado é, subsequentemente, oxidado, tal como a equação (1). O ABTS foi escolhido, uma vez que foi o doador de electrões de escolha para o ensaio de peroxidase. Na sua forma oxidada ABTS absorve a luz e, por conseguinte, pode ser determinada através de um ensaio espectrofotométrico [57].



Pipetou-se 2,20 mL de solução tampão (fosfato de potássio 100 mM, pH 5,5 a 25 °C), 0,70 mL ABTS(100mM) e 0,10 mL de H_2O_2 . As mesmas quantidades foram utilizadas para o branco. Misturou-se por inversão e equilibrou-se para 25°C. Usou-se um espetofotómetro adequado de forma ao monitor conseguir a absorvância no comprimento de onda de 436nm constante (Biotek PowerWave XT Microplate). De seguida adicionaram-se 0,05 mL de colostro aquecido a 55,60,65,70°C durante 55 min. Já no branco adicionou-se 0,05 mL de solução de fosfato de potássio (200mM). Por fim misturou-se por inversão e registou-se durante aproximadamente 2 minutos o aumento da absorvância a comprimento de onda de 436nm. Para uma melhor compreensão no Anexo A2 encontra-se descrito ao pormenor os reagentes e as quantidades utilizadas neste ensaio assim como um exemplo de cálculo para as U/mL da atividade enzimática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos do tratamento térmico na concentração de imunoglobulinas

O tratamento térmico é muito usado para preservar alimentos sendo importante conhecer os efeitos nos constituintes do colostro. A grande desvantagem deste processo encontra-se na possibilidade das imunoglobulinas desnaturarem. O processo de desnaturação pode ocorrer por: temperatura, pH extremos, pressão, luz (UV), presença de água, uso de desnaturantes, entre outros. As principais imunoglobulinas IgG, IgM e IgA foram estudadas e comparadas a diferentes temperaturas e intervalos de tempo no departamento de laticínios, gordura e cosméticos do ICT, Praga.

As proteínas podem sofrer um processo de desnaturação que depende das ligações intramoleculares não covalentes, como por exemplos: interações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e entropia conformacional. A desnaturação envolve um desdobramento inicial reversível da estrutura nativa havendo a perda da configuração globular, podendo prosseguir para a desnaturação irreversível e agregação através das interações hidrofóbicas e de dissulfeto [10]. Pode haver uma desnaturação reversível, isto é, a proteína pode voltar a sua configuração funcional ou irreversível, a proteína não consegue voltar a forma nativa.

De forma a observar o comportamento das imunoglobulinas quando submetidas a várias temperaturas e de forma a conseguir indentificá-las nos cromatogramas, numa primeira fase foi injetado no HPLC soluções padrão de lactoferrina, β -lactoglobulin, BSA e α -lactalbumin (Sigma-Aldrich) para prever os tempos de retenção de cada Ig. Um cromatograma é uma representação gráfica obtida através do detetor ao longo do tempo da variação da absorbância quando a proteína absorve a luz. O detetor dá a resposta com um pico cuja altura é dependente da concentração do componente do colostro. Num cromatograma cada deflexão da absorbância da origem a um máximo (ou pico) que representa um composto da mistura que passou através do detetor. As áreas dos picos são proporcionais à quantidade de cada composto que passou no detetor. Importante referir que não é a altura do pico que interessa mas sim a área total do pico

para a sua caracterização e quantificação. O tempo de retenção indica o tempo que o composto leva para sair da coluna de HPLC [58]. Desta forma, analisaram-se as amostras de um único bovino como descrito nos materiais e métodos por HPLC e os resultados estão apresentados nos cromatogramas seguintes, onde em cada cromatograma se encontra inserido os resultados passados 5 min, 30 min e 60 min.

3.2. Análise dos cromatogramas obtidos por HPLC

No cromatograma da Figura 3 consegue-se observar vários picos, entre os quais, foi possível identificar os picos referentes as Igs. O pico mais alto, número 1, corresponde a IgG, o pico com número 3 corresponde à IgM e o número 4 à IgA. Estas identificações foram conseguidas através duma análise de todos os constituintes do colostro bovino, dando maior ênfase aos existentes em maior quantidade, a literatura disponível e através da injeção de padrões antes mencionados. Também, segundo [55] foi possível identificar o pico número 2 corresponde a BSA. Relativamente aos picos que se encontram mais a direita do cromatograma sabe-se que os correspondentes a lactoperoxidase, lactofarina tem um tempo de retenção de 18,2 min e 15,4 min respetivamente [59]. Já α -lactalbumina e β -lactoglobulina sabe-se através da literatura que o tempo de retenção se encontra entre os 14 e os 17 min. É de salientar que os métodos utilizados para estudar a influência da temperatura dos constituintes do colostro bovino, mais especificamente das Ig têm sido: ELISA, TIA e RID sendo a HPLC um método inovador no estudo da estabilidade térmica das Ig do colostro bovino fase a estudos anteriores.

O cromatograma que se segue foi obtido pelo software Agilent ChemStation quando o colostro bovino foi aquecido a 55°C. Neste cromatograma encontra-se inserido as amostras que sofreram aquecimento passados 5 min (cor vermelha), passados 30 min (cor verde) e passados 60 min (cor azul). No entanto, estas cores não são facilmente visualizadas uma vez que se encontram sobrepostas nos picos correspondentes as Ig e a BSA, 1 e 2 respetivamente.

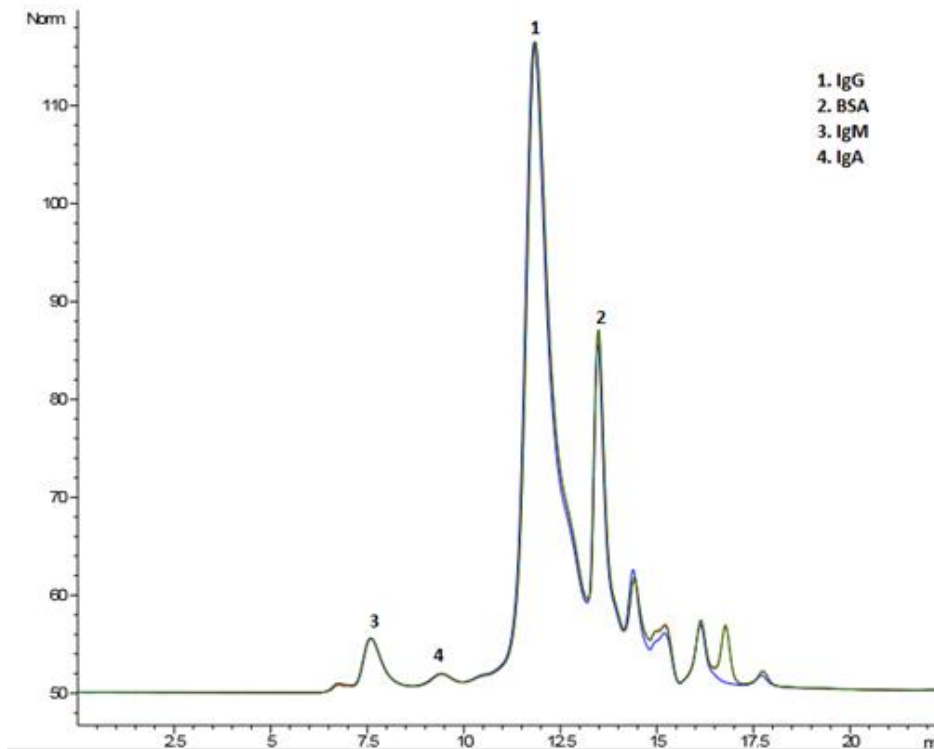


Figura 3. Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 55°C passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 ul de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200 ul de colostro bovino.

Com base no cromatograma apresentado na Figura 3 verificou-se que não existem alterações em nenhum dos picos correspondentes as Ig e ao BSA, havendo sobreposição de todas as curvas quando se fez variar o intervalo de tempo. O mesmo não aconteceu nos picos que se encontram mais à direita do cromatograma uma vez que se observam algumas variações sendo a mais acentuada passados 60 minutos (cor azul). Relativamente ao tempo de retenção, no pico correspondente à IgG foi de 11,8 min, a IgM foi de 7,6 min e no pico correspondente a IgA o tempo de retenção foi de 9,4 min. Através da literatura foi também possível identificar o pico correspondente a lactoperoxidase, cujo tempo de retenção é de 18 min.

Seguidamente, na Figura 4, encontra-se o cromatograma obtido pelo software Agilent ChemStation, quando o colostro foi aquecido a 60 °C, passados 5, 30 e 60 min. A cor azul corresponde ao cromatograma passados 5 min, vermelho passados 30 minutos e verde passados 60 minutos.

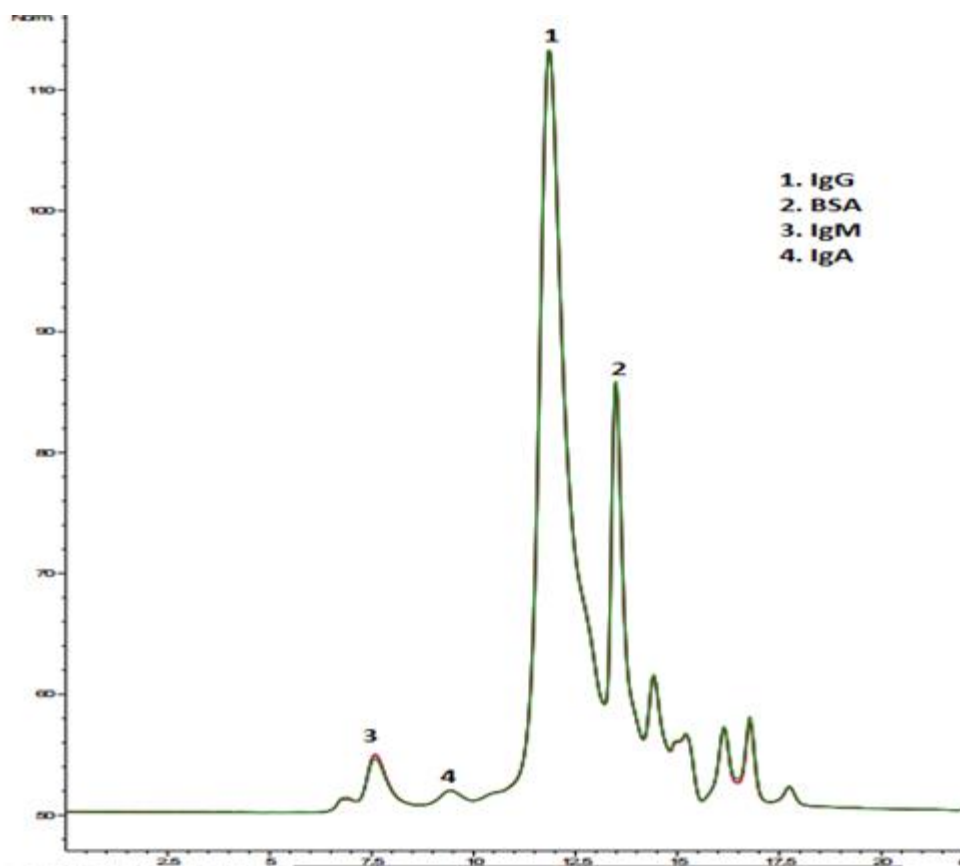


Figura 4. Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 60°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 ul de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200 ul de colostro bovino.

Com base no cromatograma apresentado na Figura 4 verificou-se que não existem alterações em nenhum dos picos correspondentes as Ig e ao BSA nem nos picos que se encontram mais a direita. Deste modo, observou-se uma sobreposição de todas as curvas quando se fez variar o intervalo de tempo. Analisando este cromatograma e comparando com o obtido anteriormente (55°C) pode-se dizer que esta temperatura é mais adequada para este processo, uma vez que a sobreposição das curvas ocorre em todos os picos que representam os constituintes existentes no colostro bovino. Importante referir que o processo de pasteurização nunca deve ser desprezado uma vez que é considerado uma mais valia no tratamento do colostro. Relativamente aos tempos de retenção, estes foram os mesmo verificados no cromatograma anterior.

Na Figura 5, encontra-se o cromatograma obtido pelo software Agilent ChemStation, quando o colostro foi submetido a 65°C. A cor azul foi usada para o cromatograma passados 5 min, a cor vermelha passados 30 min e a cor verde quando passada uma hora de aquecimento.

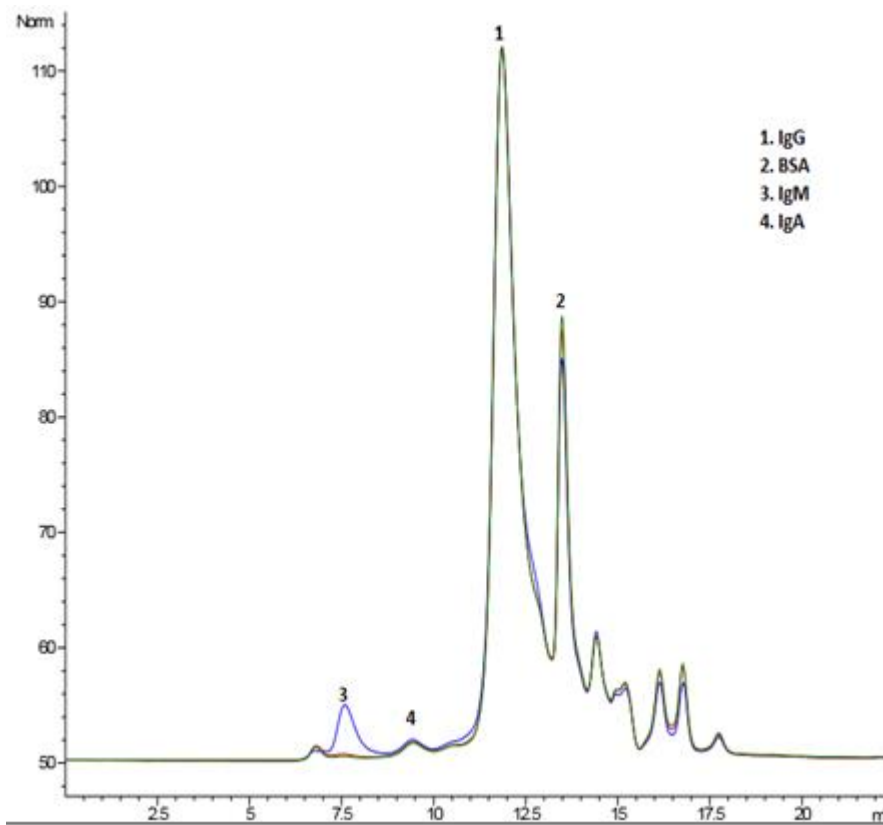


Figura 5. Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 65°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 μ l de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200 μ l de colostro bovino.

Foi possível verificar que no cromatograma relativo aos 65°C no pico 3, correspondente a IgM aos 5 min de tratamento térmico (cor azul) o pico é visível o mesmo não aconteceu passados 30 e 60 min, isto deve-se ao fato de a IgM ser a Ig menos termoestável comparando com as outras Ig existentes [60]. Relativamente ao pico correspondente à BSA, foi possível observar as 3 cores dos intervalos de tempos utilizados, significando, a perda de estabilidade térmica a esta temperatura. A altura deste pico foi maior passada 1 hora de aquecimento. Relativamente aos tempos de retenção, estes foram os mesmos verificados na Figura 3 e na Figura 4. Quando se compara a Figura referente ao tratamento aos 65°C com as figuras correspondentes aos tratamento de 55 e 60°C pode-se dizer que quando se recorreu aos 65°C observou-se

uma maior variação nos picos do BSA e da IgM. Sendo estes constituintes mais sensíveis a esta temperatura.

A Figura que se segue, representa o cromatograma relativo ao tratamento térmico de 70°C. A cor azul foi usada passados 5 min, a cor vermelha passados 30 min e a cor verde passados 60 min.

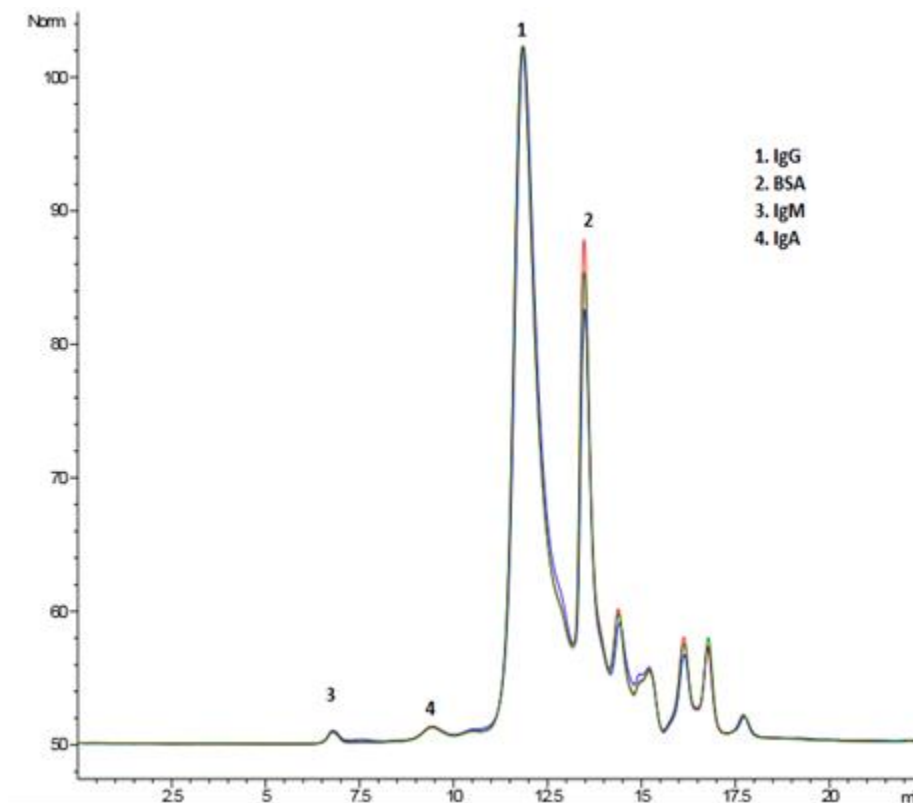


Figura 6. Cromatograma resultante de HPLC, após o colostro ser submetido a 70°C, passados 5, 30 e 60 min. As amostras foram carregadas no HPLC com 1800 ul de solução tampão (35mM de ácido acético + 25 mM de acetato de sódio tihidratado) e 200 ul de colostro bovino.

Quando se recorreu aos 70°C, observou-se uma diminuição na altura pico 3, a diferença é mais nítida quando se compara o cromatograma presente na Figura 3 (55°C). Relativamente ao pico 4, este manteve-se constante ao longo do tempo. O mesmo não se verificou no pico correspondente a BSA, uma vez que a partir dos 65°C foi visível as mudanças consoante o intervalo de tempo usado. Numa maneira geral, o pico de IgG foi o que verificou menos mudanças quando se fez variar o tempo e as temperaturas. Também foi possível observar a estabilidade térmica da LP (tempo de retenção 18 min), uma vez que não houve grandes mudanças no pico que se encontra mais a direita. Relativamente a LP sabe-se que a sua desnaturação pelo calor começa a

partir dos 80°C. Ainda assim, com estes cromatogramas, nada se pode confirmar em concreto, sendo necessário recorrer ao valor das áreas de cada pico para concluir numa forma mais precisa as variações verificadas e assim relacionar com as concentrações de cada constituinte.

3.3. Análise das áreas obtidas nos cromatogramas após tratamento térmico

De forma a conseguir uma análise mais profunda e conclusiva dos cromatogramas anteriores, através dos software Agilent ChemStation, foi possível obter os valores das áreas (Anexo A3) e assim efetuar o estudo da influência da temperatura nas áreas de cada pico. É importante referir que as áreas dos picos foram usadas de forma a fazer uma análise qualitativa das concentrações das imunoglobulinas. Isto é, se houver registo de uma diminuição da área por consequência haverá também uma redução na concentração da proteína. Contudo, não foi possível quantificar a concentração exata uma vez a não ter sido disponibilizado um padrão.

3.3.1. Estabilidade térmica da IgG.

As imunoglobulinas são as proteínas do soro de leite mais estáveis ao calor, devido ao seu elevado teor de ligações dissulfureto e componentes tais como gorduras, hidratos de carbono, lactose, sais e outras proteínas que ajudam na estabilização de anticorpos durante o tratamento térmico. Além disso, a reatividade imunológica de anticorpos IgG é a mais resistente quando comparada com as restantes imunoglobulinas (IgA, IgM) [61].

De seguida, no Gráfico 1, é possível observar a estabilidade térmica da IgG, uma vez que está representado graficamente as áreas obtidas por HPLC, ao longo de todo o tratamento térmico durante 1 hora do pico correspondente a IgG.

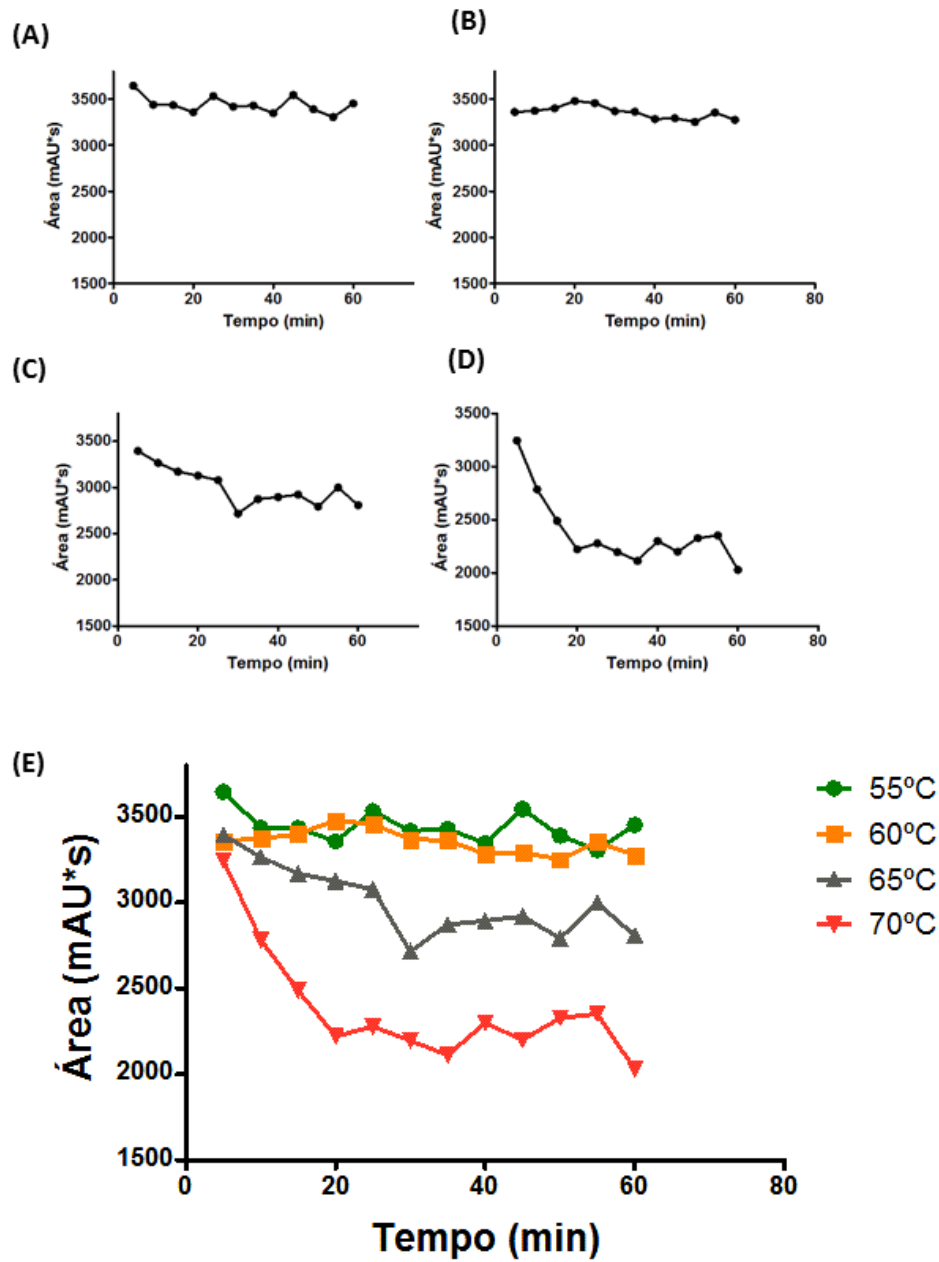


Gráfico 1. Representação gráfica da da área correspondente a IgG monitorizada por HPLC, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min.

Com base no Gráfico 1(A) verificou-se que a área do pico observada nos cromatogramas anteriores correspondente a IgG não sofreu variações drásticas. Nos primeiros 10 minutos de aquecimento a 55°C houve uma redução de 3645 mAU*s para 3437 mAU*s. Passado 1 hora de tratamento térmico a área foi de 3452 mAU*s, sendo a redução verificada de 5,3 %. As oscilações registadas variaram entre 3600 mAU*s e 3300 mAU*s. No Gráfico 1(B) a situação foi semelhante, uma vez que não houve grande variação. No início do tratamento térmico a 60°C a área foi de 3350 mAU*s, passados 60 min o valor registado foi de 3275 mAU*s, sendo a redução de 2,3%. Houve um máximo (3479 mAU*s) após 20 min de aquecimento. Já no Gráfico 1 (C), o comportamento da área relativa a IgG foi diminuindo ao longo dos 60 min. Passados 5 min de aquecimento a 65°C a área foi de 3394 mAU*s e passada 1 hora desceu para 2807 mAU*s, havendo uma redução de 17,3 % no valor da área, um valor mais elevado fase as outras temperaturas utilizadas. Relativamente ao Gráfico 1(D), quando se recorreu aos 70°C a área foi sempre diminuindo. Esta reduziu de 3245 mAU*s passado 5 min para 2028 mAU*s após 1 hora. A redução verificada foi de aproximadamente 38%. Nos primeiros 20 minutos houve uma descida drástica no valor da área, dos 3245 mAU*s para 2221 mAU*s, o que evidencia a perda de estabilidade térmica da IgG quando submetida a esta temperatura. O gráfico 1 (E), foi desenhado de forma a comparar os valores das áreas obtidas relativamente a todos os tratamentos térmicos efetuados. Assim, foi possível verificar que quando se recorreu aos 70°C a área sofreu maior redução quando comparada com as outras temperaturas e por consequência uma maior diminuição na concentração de IgG. A área que se mostrou mais constante foi quando se recorreu aos 60°C, mantendo-se sempre a volta dos 3300 mAU*s aproximadamente. Após uma análise do comportamento da variação da área ao longo do tempo consoante as temperaturas utilizadas e fazendo relação com a concentração aproximada da IgG, pode-se dizer que a temperatura de 60°C é a ideal para este processo térmico, ainda assim, havia a hipótese de complementar este resultado com estudos de contaminação microbiana para poder confirmar com a literatura. Relativamente ao tempo, confirmou-se que os 60 min não faziam variar consideravelmente a concentração de IgG. Como a IgG não desnaturou, a conformação nativa foi mantida ao longo de todo o tratamento.

Outro aspeto importante é que a desnaturação de uma proteína de múltiplos domínios, como a IgG pode ser descrita como um processo em que os domínios podem

ser afetados de forma independente e em ordens diferentes, dependendo das condições. Neste caso, quando a IgG é submetida a tratamento térmico o local de ligação do antígeno no fragmento Fab desnaturava mais rapidamente a uma temperatura mais baixa do que a região Fc. Segundo [62], as alterações estruturais na IgG quando aquecida encontravam-se principalmente em fragmentos Fab, onde o local de ligação ao antígeno está localizado e é mais sensível a tratamento térmico, do que o fragmento Fc, que é mais afetado quando os valores de pH diminuem [63].

Uma vantagem no tratamento térmico do colostro é a possibilidade de aumentar a absorção de IgG. Os anticorpos no colostro bovino foram observados a ligar-se a agentes patogénicos presentes no intestino antes que o processo da absorção acontecesse. O reduzido número de agentes patogénicos no colostro tratado termicamente, fazia com que houvesse uma menor interferência dos recetores para bloquear a absorção de Ig, melhorando a AEA. Esta eficiência na absorção diminuía o risco da falha de transferência passiva sendo uma grande vantagem para a alimentação e saúde dos bezerros[10].

Relativamente a atividade biológica, para que uma proteína conseguisse a sua atividade, devia adotar a sua estrutura tridimensional correta. Assim, as alterações provocadas pelo aquecimento, nas estruturas secundárias ou terciárias podiam ser responsáveis pelas alterações na atividade biológica. No entanto, é importante referir que, algumas temperaturas podiam causar algum desdobraimento reversível da estrutura tridimensional.[64].

Após uma análise dos estudos efetuados neste assunto confirma-se que o tratamento térmico do colostro realizado no Departamento de Lípidos, Lactícneos e Cosméticos da Faculdade de Alimentos e Bioquímica Tecnológica no ICT de Praga manteve a viscosidade e as concentrações de IgG foram relativamente constantes para as temperaturas 55 e 60°C registando algumas variações quando se recorreu aos 65 e 70°C, demonstrando assim a perda da estabilidade térmica.

3.3.2. Estabilidade térmica de IgA

A estabilidade térmica da IgA, será percebida nos gráficos que se seguem, uma vez que se encontra representado graficamente a variação das áreas do pico

correspondente a IgA obtidas por HPLC, mais especificamente pelo software Agilent ChemStation, ao longo de todo o tratamento térmico a 55,60,65 e 70°C durante 1 hora. O reduzido valor da área é indicativo de uma reduzida concentração de IgA no colostro bovino.

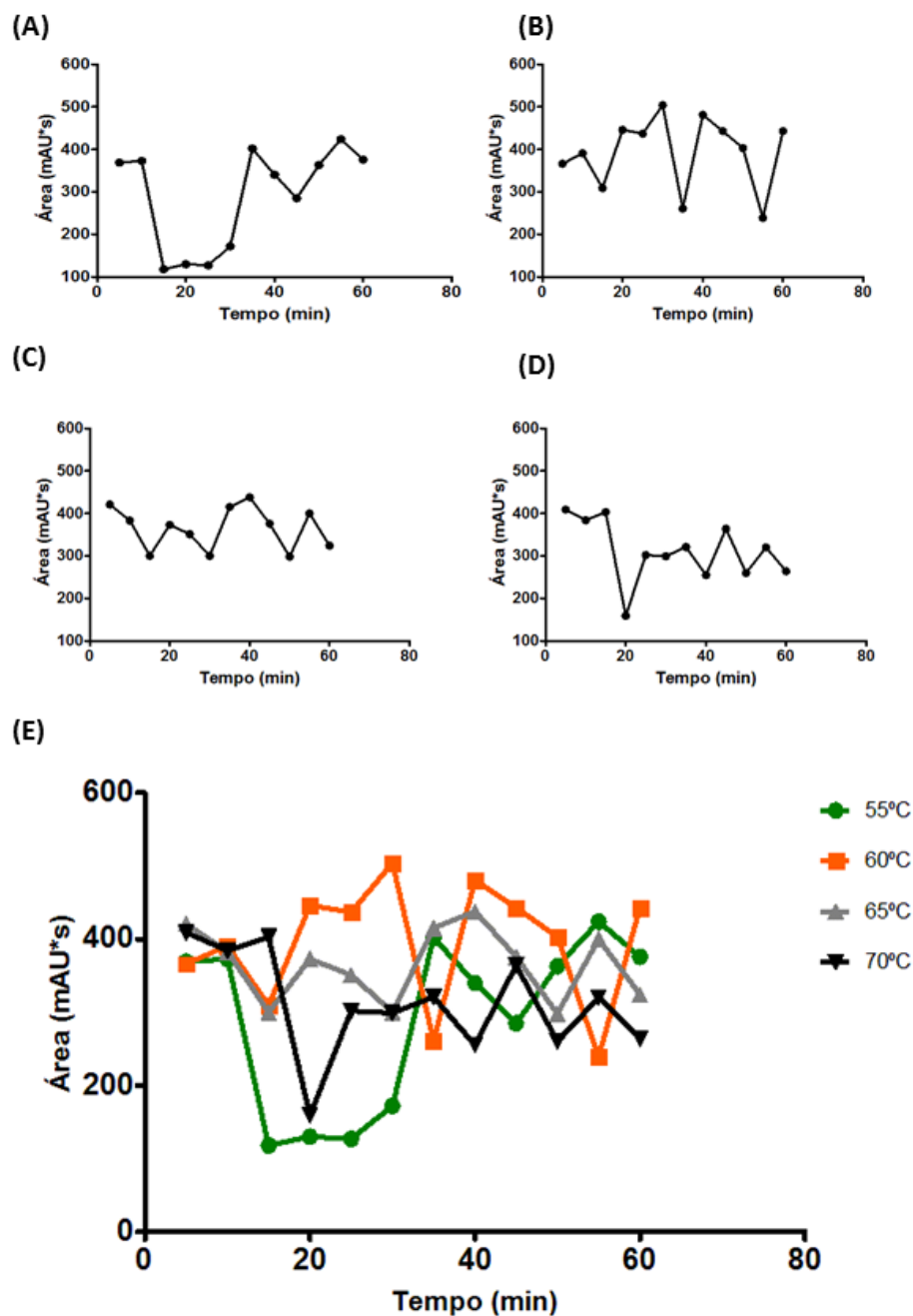


Gráfico 2. Representação gráfica da da área correspondente a IgA monitorizada por HPLC, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C, (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min.

A maior diferença encontrada no Gráfico 2 comparativamente ao Gráfico 1 está nos valores das áreas, uma vez que no Gráfico 1 estes encontram-se maioritariamente a volta dos 3000 mAU*s e neste Gráfico os valores desceram drasticamente para 300 mAU*s indicando uma grande discrepância nos valores das concentrações de Ig. Relativamente ao Gráfico 2 (A), verificou-se que quando o colostro bovino foi aquecido a 55°C, houve um decréscimo no valor da área do pico correspondente a IgG de 369 mAU*s para 118 mAU*s nos primeiros 15 min. Seguidamente, foi possível visualizar um aumento até 402 mAU*s passados 20 min. Posteriormente houve novamente uma diminuição da área para 285 mAU*s e por fim passada 1h de tratamento térmico a área registada foi de 376 mAU*s. No Gráfico 2 (B) quando se recorreu aos 60°C, foi possível observar oscilações entre os 250 mAU*s e os 500 mAU*s. No Gráfico 2 (C), tratamento térmico de 65°C, as oscilações foram entre 300 mAU*s e e 438 mAU*s ao fim de 1 hora de tratamento o valor da área foi de 324 mAU*s. No Gráfico 2 (D), quando o colostro foi submetido a 70°C passados 5 min o valor da área era de 409 mAU*s e ao fim de 60 min foi de 264 mAU*s. Contudo foi possível visualizar uma descida acentuada passados 20 min de aquecimento. No Gráfico 2 (E) verificou-se que o valor da área andou sempre a volta dos 200 mAU*s e os 500 mAU*s aproximadamente. Relativamente a redução da área quando se recorreu aos 65°C esta foi de ~23% e aos 70°C de ~35% no fim de uma hora de tratamento. As variações encontradas nos gráficos que representam o resultado de HPLC monitorizado a diferentes temperaturas e durante 1 hora foram enormes e a baixa concentração de IgA dificultou a análise da estabilidade térmica da IgA. Segundo [60], a IgA é relativamente mais estável do que a IgM, isto foi possível comprovar através das percentagens de redução da área quando se recorreu aos 65 e aos 70°C.

De forma a otimizar estes resultados, uma boa alternativa seria repetir, pelo menos, 6 vezes este método de forma a conseguir encontrar a correlação entre a variável da temperatura e a da área e também para confirmar os valores obtidos nesta experiência.

3.3.3. Estabilidade térmica da IgM

A estabilidade térmica da IgM, será percebida nos gráficos que se seguem, uma vez que se encontra representado graficamente a variação das áreas do pico

correspondente a IgM nos cromatogramas obtidas por HPLC, pelo software Agilent ChemStation ao longo de todo o tratamento térmico durante 1 hora. O reduzido valor da área é indicativo de uma reduzida concentração de IgM no colostro bovino.

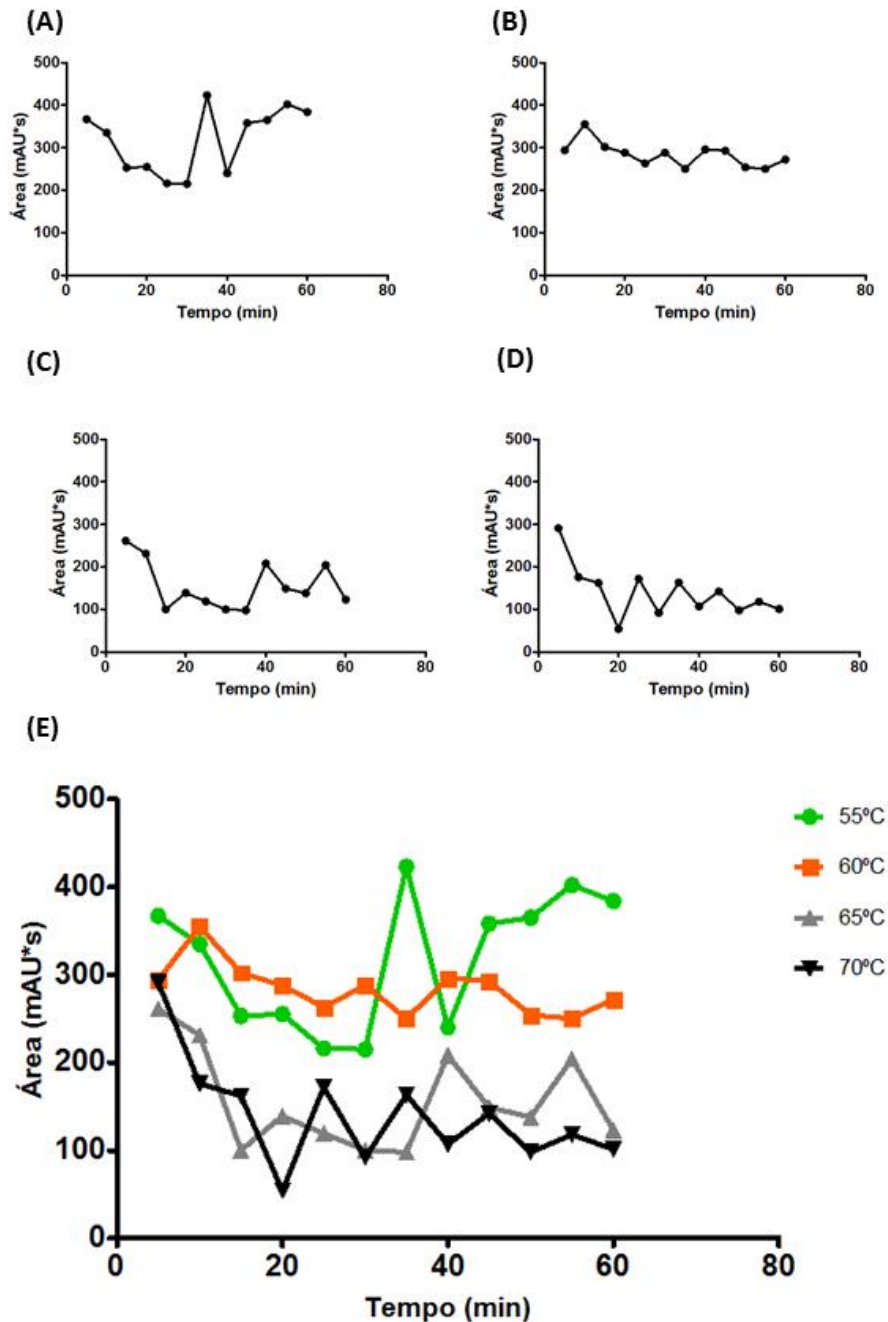


Gráfico 3. Representação gráfica da monitorização por HPLC da área correspondente a IgM do colostro bovino, quando submetida a: (A) 55°C, (B) 60°C, (C) 65°C, (D) 70°C, (E) todas as temperaturas, ao longo de 60 min.

Através do Gráfico 3 foi possível visualizar as mudanças que ocorreram a nível do valor da área do pico correspondente a IgM. É de salientar a relação existente entre o valor da área e a concentração da Ig. Assim, no Gráfico 3 (A) onde o colostro foi aquecido a 55°C verificou-se uma oscilação no valor da área entre 200 mAU *s e os 400 mAU *s, sendo que o valor no início do tratamento foi de 369 mAU *s, passada meia hora o valor sofreu uma descida para 215 mAU *s, após 35 min houve um máximo registado no valor de 423 mAU *s e no fim foi de 384 mAU *s. Assim, pode-se dizer que o valor da área foi bastante variável. Já no Gráfico 3 (B), quando o colostro foi submetido a 60°C, a situação foi mais equilibrada, uma vez que as variações registadas foram mais amenas. Numa fase inicial, logo no início do tratamento passados 10 min, observou-se um pequeno aumento no valor da área, dos 294 mAU *s para 355 mAU *s. Seguidamente o valor da área correspondente a IgM, sofreu pequenas oscilações entre 250 mAU *s e 300 mAU *s. Após 1 hora de tratamento térmico a 60 °C o valor da área registado pelo software foi de 272 mAU *s. No Gráfico 3 (C), foi possível verificar uma redução no valor da área, uma vez que no início do tratamento térmico a 65°C o valor da área era de 261 mAU *s e passada uma hora o valor registado foi de 123 mAU *s, havendo uma redução de 53% aproximadamente. Relativamente ao Gráfico 3(D) quando o tratamento térmico foi de 70°C o comportamento da área foi semelhante ao Gráfico 3(C), uma vez que também se verificou uma redução. Nos primeiros 20 min de tratamento houve uma diminuição no valor da área bastante considerável dos 291 mAU *s para 54 mAU *s variação esta que pode ser explicada pela perda da estabilidade térmica, sendo a proteína mais sensível a esta temperatura. No início do tratamento o valor da área era 291 mAU *s passada uma hora o valor registado foi de 101 mAU *s. Sendo a redução de 66% aproximadamente. Já no gráfico 3 (E) foi possível visualizar mais nitidamente o efeito que a temperatura causou no valor da área do pico correspondente a IgM e por sua vez na concentração da mesma. Observou-se que o valor da mesma aos 60 °C manteve-se a volta dos 300 mAU *s, o mesmo não ocorreu quando se recorreu a temperaturas mais elevadas (65 e 70°C) uma vez que houve uma diminuição considerável no valor da mesma dos 300 mAU *s aproximadamente para os 100 mAU *. Relativamente as percentagens de redução do valor das áreas no tratamento térmico a 65 e 70°C na IgM, estas foram claramente superiores em relação as verificadas na IgA (Gráfico 2). No que diz respeito a temperatura ideal, outra vez confirmou-se que é aos 60°C .

3.3.4. Comparação da estabilidade térmica das Ig

Após a análise dos vários gráficos apresentados anteriormente, foi possível constatar que a IgG possui uma maior estabilidade térmica quando comparadas com a IgA e IgM. Uma vez que mesmo diminuindo o valor da concentração de IgG passada uma hora de aquecimento a 70°C, esta imunoglobulina continuava a desempenhar a sua atividade. Os gráficos relativos a IgM e a IgG comprovaram que a temperatura ótima para este processo seria a 60°C uma vez que fizeram manter aproximadamente constante durante 1 hora o valor da concentração das Ig ao longo de todo o tratamento efetuado.

De forma a encontrar a relação entre duas variáveis: a temperatura e a área dos picos correspondentes a cada Ig, devia efetuar-se o gráfico da correlação com o intuito de saber se as alterações sofridas por uma das variáveis eram acompanhadas pelas alterações da outra, por outras palavras, tentava-se medir a força que mantinha unidos este conjunto de valores. Caso a correlação fosse negativa ou inversa, indicaria que a medida que a variável da temperatura aumentava a variável correspondente a área diminuía. Caso a correlação fosse nula $r = 0$ indicaria que os valores ocorriam independentemente uns dos outros. Se pelo contrário fosse positiva, $0 < r < 1$, indicaria que valores crescentes de temperaturas estavam associados a valores crescentes da área.

As alterações estruturais causadas pelo aquecimento foram também estimadas através da perda de imunorreatividade ou seja através do método de ELISA, este foi usado para estimar a atividade de ligação ao antigénio de IgG para lipopolissacarídeos bacterianos depois do tratamento térmico. Este método apresenta elevada especificidade e sensibilidade. No entanto, é muito susceptível a erros de pipetagem, alterações dos reagentes, variações nos tempos de incubação e lavagem. Contudo, este estudo não obteve resultados satisfatórios, possivelmente devido as falhas descritas anteriormente, motivo pela qual não foi incluído nesta dissertação.

É de referir que a escassez de tempo impossibilitou a repetição de amostragens e por consequência a análise estatística não se realizou. Um dos motivos que levou a esta falha foi a realização, em paralelo, de outras técnicas e ensaios para estudos que estavam em desenvolvimento no Departamento de Lacticínios, Gordura e Cosmética do ICT.

3.4. Estabilidade térmica da lactoperoxidase

A lactoperoxidase, proteína antibacteriana, foi motivo de análise, devido a ser o constituinte, segundo a bibliografia, com maior estabilidade térmica. No gráfico seguinte é possível observar a atividade da lactoperoxidase após o colostro ter sido submetido a 55, 60, 65 e 70°C durante 55 min.

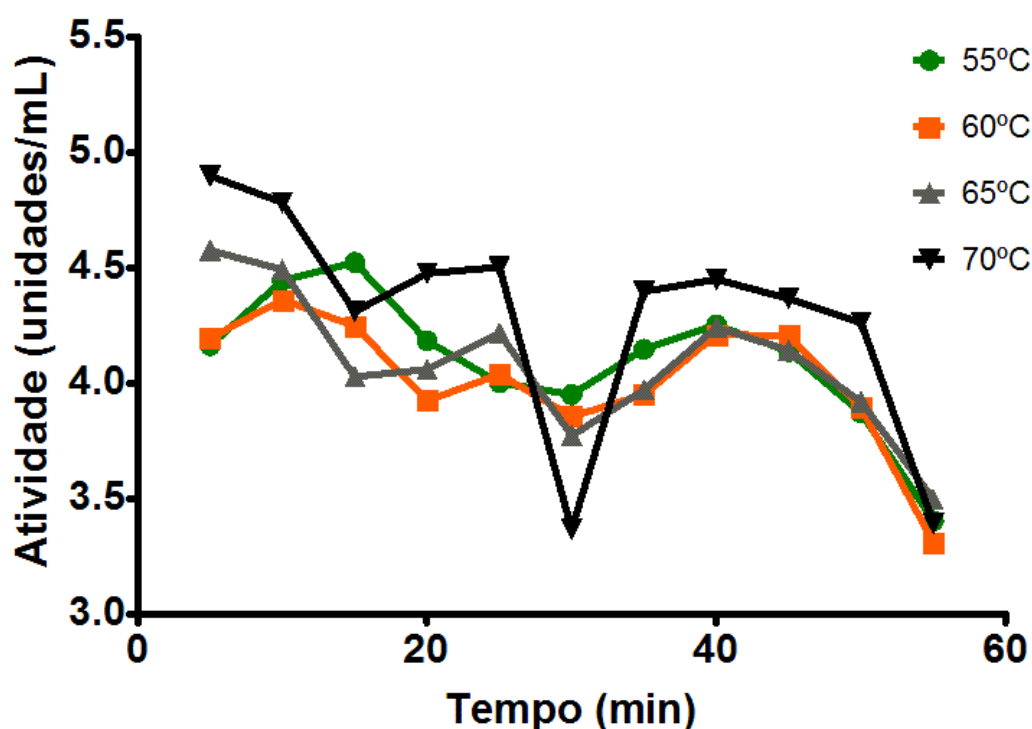


Gráfico 4. Atividade da lactoperoxidase a 55°C,60°C,65°C e 70°C. O ensaio enziático realizado segundo Kessey,J., 1987 e Putter, J., 1983, usando ABTS como substrato.

Através deste gráfico foi possível observar o comportamento da atividade da LP quando submetido a diferentes temperaturas. Numa fase inicial do estudo, isto é aos 5 minutos, a atividade da lactoperoxidase era de aproximadamente 4 U/mL para as temperaturas de 55 e 60°C. Para os 65°C a atividade inicial era de 4,5 U/mL e aos 70°C a atividade era de quase 5 U/mL. Após 55 min de tratamento a atividade da LP foi de aproximadamente 3,5 U/ml para todas as temperaturas usadas neste estudo. Na curva correspondente ao tratamento a 70 °C,observou-se uma redução da atividade aos 30 min, mas este fato foi devido a um erro de pipetagem na preparação da amostra. A

análise da atividade antimicrobiana desta enzima foi efetuada numa forma rápida, fácil e com custos reduzidos sendo uma grande vantagem face a outros métodos que podiam ter sido utilizados.

Este gráfico vem confirmar a hipótese desta proteína ser muito estável termicamente, uma vez que o comportamento da atividade desta enzima esteve sempre a volta dos 4-4,5 U/mL descendo para 3,5 U/mL passados 55 min. Isto é, as mudanças de temperatura (55,60,65,70°C) durante 55 min não influenciaram a atividade da mesma. Uma alternativa de avaliar a atividade da LP era recorrer a outros substratos no ensaio enzimático ou através do sistema de LP em conjunto com o pH baixo reduzir a população de *E. Coli* e *Shigella Sp*[65]. Estas duas opções tinham sido interessantes de desenvolver neste estudo de modo a completar os resultados obtidos a nível da Lp.

Foi visto que a atividade da Lp a partir dos 72°C começava a reduzir de forma acentuada. Aos 78°C durante 15s era desativada e aos 80°C durante 2,5s ocorria a desnaturação. No leite de vaca a atividade da Lp registada foi de 2,3 U/mL. Comparando com a lisozima a LP possui maior poder antibacteriano devido a baixa especificidade do mecanismo[26].

Relativamente ao processo de pasteurização, onde a Lp desempenha um papel importante, e após uma análise aprofundada dos vários tipos e do efeito que provocavam, o HTST, foi o processo escolhido como sendo o mais adequado para o colostro bovino, uma vez que usando 72°C durante 15 segundos conseguia-se diminuir acentuadamente os microorganismos existentes no colostro bovino não havendo grande interferência no desempenho da atividade da lactoperoxidase nem da IgG, constituintes do colostro de maior destaque. A atividade da LP após HTST era de ~70%, sendo esta percentagem capaz de catalisar a reação entre SCNK e H₂O₂ [26]. Foi investigado o custo do equipamento e viu-se que este podia ir entre os \$5000 até os \$15000 dependendo do tamanho[66].

Uma única amostra foi analisada neste método, o que impossibilita, mais uma vez, a realização da análise estatística. Para além da escassez de tempo outra razão pela qual não houve repetições recai no fato da dificuldade de acesso ao espectrofotómetro no Departamento de Lacticínios, Gordura e Cosmética do ICT, Praga.

4. CONCLUSÃO

A caracterização das proteínas constituintes do colostro bovino quando submetidas a tratamento térmico foram analisadas através da cromatografia líquida de elevada eficiência em fase reversa e do ensaio enzimático da atividade da lactoperoxidase, de forma a saber, os efeitos que provocavam nas concentrações das Ig e na atividade lactoperoxidase.

Quando se recorreu ao método cromatográfico, as imunoglobulinas, mais precisamente a IgG, foi estudada ao pormenor, devido à sua importância. Através das áreas dos cromatogramas foi possível relacionar as concentrações de IgG presentes no colostro bovino após o aquecimento. Foi possível verificar que existe pouca influência da temperatura na concentração de IgG uma vez que quando se recorria aos 70°C não ocorria a desnaturação proteica sendo mantida a sua estrutura nativa. Relativamente à temperatura mais adequada para este processo, 60°C é a ideal, uma vez que mostrou ser a que menos fazia variar as concentrações de IgG e de IgM ao longo de uma hora Gráfico 1 (B) e Gráfico 3 (B).

Segundo a literatura, a IgA é mais estável termicamente do que a IgM isto foi comprovado através da redução da área dos picos respetivos. A IgM registou uma redução da área de ~53% quando se recorreu aos 65°C e de ~66% quando se recorreu aos 70°C, já na IgA estas percentagens foram menores a 65°C esta foi de ~23% e aos 70°C a redução verificada foi de ~35%.

A estabilidade térmica da lactoperoxidase foi estudada e verificou-se que o comportamento da sua atividade pouco mudou ao longo do tempo quando esta sofria aquecimento. Passados 55 min, ao longo das várias temperaturas utilizadas, a sua atividade era praticamente a mesma o que vai de acordo com a bibliografia (Gráfico 4).

A nível industrial, as empresas interessadas no uso do colostro bovino previamente aquecido, têm a barreira de todos os custos que este processo tem associado. Contudo, é necessário discutir até que ponto os consumidores estão dispostos a pagar por um alimento que visa melhorar a saúde.

O processo de pasteurização elimina as bactérias e também provoca uma redução no número de organismos de deterioração e, conseqüentemente, uma extensão de vida de armazenamento do produto. Assim, a economia de produção de alimentos tinha a possibilidade de melhorar e ao mesmo tempo crescer, permitindo longos ciclos de produção e entrega a mercados mais distantes. Apesar das vantagens óbvias para a indústria como um todo e para o consumidor, estes processos de tratamento térmico só serão implementados caso forem robustos, confiáveis, apresentarem baixo custo de capital e de funcionamento e caso exista uma justificação clínica que comprove a eficiência dos mesmos.

Relativamente a outros métodos cromatográficos, a cromatografia de afinidade, que se baseia no reconhecimento molecular pode ser usado na separação de anticorpos do colostro bovino com elevado grau de pureza, IgG e IgA. No entanto, considerando a escala de produção e de custos, esta tecnologia é limitada para ser aplicada em escala comercial. Por outro lado, a cromatografia de interação hidrofóbica é a técnica promissora na separação de macromoléculas biológicas especialmente anticorpos do colostro bovino com custos relativamente baixos e elevada eficiência. Além disso, as substâncias moleculares do colostro bovino, com tamanho mais reduzido, como por exemplo, a lactose, vitaminas e oligosacáridos, podem ser isoladas por processos de filtração como por exemplo: a nanofiltração ou a ultrafiltração.

Por fim, é importante realçar alguns aspetos que devem ser melhorados neste estudo. A ausência de repetições foi uma falha relevante nesta dissertação uma vez que impossibilitou a realização da análise estatística. Seria necessário fazer pelo menos 6 repetições de forma a conseguir um resultado mais completo. Outra ideia de otimizar o estudo, seria recorrer a outras amostras de colostro bovino, isto é, realizar a experiência com colostro de vários bovinos com o intuito de poder comparar e confirmar os dados obtidos. O fato de não ter sido efetuada a quantificação exata das concentrações da proteína, devido a falta de padronização para quantificar as proteínas e não ter sido efetuada uma análise microbiológica após aquecimento do colostro, são considerações relevantes para um próximo estudo nesta área de forma a conseguir resultados mais precisos e promissores para as indústrias interessadas na produção de nutracêuticos.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspetivas futuras e de forma a completar e clarificar alguns pontos deste trabalho, seria importante numa primeira fase fazer a quantificação das concentrações de Ig para saber exatamente o que acontece com as concentrações das Ig ao longo do todo o tratamento térmico. Outra ideia interessante seria recorrer ao método de RID e TIA de forma a poder comparar aos estudos já realizados neste tema. Outros métodos que se mostram promissores e que seriam relevantes de realizar seria a cromatografia de afinidade, sendo esta a mais utilizadas para os anticorpos monoclonais, e a cromatografia de interação hidrofóbica para o isolamento e purificação do colostro. A análise microbiológica também seria essencial para complementar este trabalho uma vez a saber quais os microrganismos resistentes a 70°C e saber que efeito tinham no bezerro.

A nível industrial, seria excelente continuar com este estudo de forma a convencer as indústrias farmacêuticas a apostar no uso do colostro bovino aquecido para o fabrico de nutracêutico ou suplemento alimentar. Um nutracêutico é uma substância que pode ser alimento ou parte do alimento que proporciona benefícios de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças. Uma boa estratégia para persuadir a indústria a produção seria garantir que o nutracêutico aumentaria a esperança média de vida da população. Os maiores centros de produção destes alimentos funcionais encontram-se nos EUA, Japão, Alemanha, França e Holanda. Estas indústrias tinham que assegurar que num futuro próximo haveria uma grande adesão por parte da população ao consumo destes suplementos alimentares de forma a garantir às indústrias interessadas que o seu elevado investimento seria uma mais valia para a população mundial. É importante considerar, que a parte da regulamentação nunca pode ser deixada de lado assim como as questões da ética.

Outra aplicação a nível humano seria o uso do colostro aquecido para a criação de bancos de leite, de forma a serem utilizados em situações que a progenitora não conseguisse amamentar. Nestes bancos, o leite deve ser pasteurizado pelo método Holder (62.5 °C durante 30 min). Já na produção animal, nas fazendas onde se realizam as ordenhas, deveria ser obrigatório a existência de um banco do colostro bovino assim como a existência de pessoas altamente qualificadas para esta administração. Esta

administração artificial, tinha de ser feita obrigatoriamente efetuada até seis horas após o parto. É importante referir a vantagem no uso do colostro bovino relativamente ao humano, este para além de apresentar custo reduzido, a sua obtenção é relativamente fácil e através da produção animal seria possível obter colostro bovino em grandes quantidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. L. Godhia and N. Patel, “Colostrum - Its Composition , Benefits As A Nutraceutical : A Review,” vol. 1, no. 1, pp. 37–47, 2013.
- [2] F. . Uruakpa, M. a. . Ismond, and E. N. . Akobundu, “Colostrum and its benefits: a review,” *Nutr. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 755–767, Jun. 2002.
- [3] I. Hassum, “Produção Animal - Portal Embrapa.” [Online]. Available: <https://www.embrapa.br/meio-norte/pesquisa-e-desenvolvimento/producao-animal>. [Accessed: 14-Mar-2015].
- [4] M. I. Donahue, “Heat-Treatment of Colostrum: Effects on Colostrum Characteristics and on Passive Transfer and Health in Commercial Dairy Calves,” 2010.
- [5] M. Wu, X. Wang, Z. Zhang, and R. Wang, “Isolation and Purification of Bioactive Proteins from Bovine Colostrum,” 2007.
- [6] J. J. Gross, E. C. Kessler, and R. M. Bruckmaier, “Colour measurement of colostrum for estimation of colostral IgG and colostrum composition in dairy cows.,” *J. Dairy Res.*, vol. 81, no. 4, pp. 440–4, Nov. 2014.
- [7] A. J. Heinrichs, “R Colostrum : Heat Treating Bovine eview,” vol. 24, pp. 530–538, 2008.
- [8] Morein B.; Blomqvist G., “Immune responsiveness in the neonatal period,” 2007. [Online]. Available: http://ac.els-cdn.com/S0021997507000564/1-s2.0-S0021997507000564-main.pdf?_tid=1a1ec9e2-b07f-11e4-8345-00000aacb361&acdnat=1423502247_2218a7ce7a17c0dd5bc0b6548b5e7eff. [Accessed: 09-Feb-2015].
- [9] H. Nousiainen, J., Korhonen, “The effect of colostral immunoglobulin supplement on the passive immunity, growth and health of neonatal calves,” *Agric. Sci. Finl.* 3, pp. 421–427, 1994.

- [10] J. Alberto and E. Salazar, “Heat treatment of bovine colostrum: effects on physical and chemical properties and on neonatal blood and growth parameters,” University of Pennsylvania, 2008.
- [11] J. Davis, C., Drackley, *The development, nutrition and Management of the young calf*, 1 edition. Iowa State Press, 1998.
- [12] I. of M. (US) C. on N. S. D. P. and Lactation, “Nutrition During Lactation.” National Academies Press (US), 1991.
- [13] B. L. Larson and G. D. Roller, “Heat Denaturation of the Specific Serum Proteins in Milk,” *J. Dairy Sci.*, vol. 38, no. 17, pp. 351–360, 1955.
- [14] J. E. Butler, “Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals.,” *Rev. Sci. Tech.*, vol. 17, no. 1, pp. 43–70, Apr. 1998.
- [15] W. R. Clark, *In defense of self: how the immune system really works*. 2008, p. 265.
- [16] J. Cruse and R. Lewis, *Atlas of immunology*, Second Edi. 2004.
- [17] T. E. Besser and C. C. Gay, “The importance of colostrum to the health of the neonatal calf.,” *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, vol. 10, no. 1, pp. 107–17, Mar. 1994.
- [18] R. Pakkanen and J. Aalto, “Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum,” *Int. Dairy J.*, 1997.
- [19] H. Virtala, A.; Grohn, Y.; Mechor, G.; Erb, “The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life,” *Prev. Vet. Med.*, 1999.
- [20] G. A. Donovan, I. R. Dohoo, D. M. Montgomery, and F. L. Bennett, “Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA.,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 31–46, Feb. 1998.
- [21] J. D. Robison, G. H. Stott, and S. K. DeNise, “Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer.,” *J. Dairy Sci.*, vol. 71, no. 5, pp. 1283–7, May 1988.

- [22] J. K. Actor, S.-A. Hwang, and M. L. Kruzel, "Lactoferrin as a natural immune modulator.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 17, pp. 1956–73, Jan. 2009.
- [23] T. Ochoa, Noguera-Obenza., and T. Cleary, *Protecting Infants through Human Milk*, vol. 554. Boston, MA: Springer US, 2004, p. 463.
- [24] M. Mitoma, T. Oho, Y. Shimazaki, and T. Koga, "Inhibitory effect of bovine milk lactoferrin on the interaction between a streptococcal surface protein antigen and human salivary agglutinin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 21, pp. 18060–5, May 2001.
- [25] E. Seifu, E. M. Buys, and E. F. Donkin, "Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 16, no. 4, pp. 137–154, Apr. 2005.
- [26] E. Buys, "Physicochemical Properties of Lactoperoxidase," pp. 319–323, 2011.
- [27] M. C. Martín-Hernández, B. W. van Markwijk, and H. J. Vreeman, "Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk.," *Netherlands Milk Dairy J.*, vol. 44, no. 3–4, pp. 213–231, 1990.
- [28] K. D. Kussendrager and A. C. M. van Hooijdonk, "Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications," *Br. J. Nutr.*, vol. 84, no. S1, pp. 19–25, Mar. 2007.
- [29] N. Benkerroum, "Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk," *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 25. Academic Journals (Kenya), 2008.
- [30] J. Just, "<http://byo.com/hops/item/1030-lysozyme>," 2004. [Online]. Available: <http://byo.com/hops/item/1030-lysozyme>. [Accessed: 12-Feb-2015].
- [31] B. Lönnerdal and E. L. Lien, "Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants.," *Nutr. Rev.*, vol. 61, no. 9, pp. 295–305, Sep. 2003.
- [32] P. Marnila and H. Korhonen, *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2004, pp. 473–478.

- [33] G. Kontopidis, C. Holt, and L. Sawyer, “Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function.,” *J. Dairy Sci.*, vol. 87, no. 4, pp. 785–96, Apr. 2004.
- [34] N. R. C. (US) C. on D. and C. of J. Disease, “Diagnosis and Control of Johne’s Disease.” National Academies Press (US), 2003.
- [35] M. I. Donahue, “Heat-Treatment of Colostrum: Effects on Colostrum Characteristics and on Passive Transfer and Health in Commercial Dairy Animals,” University of Minnesota, 2010.
- [36] “Bovine Colostrums: A review of Clinical Uses.” [Online]. Available: <http://www.altmedrev.com/publications/8/4/378.pdf>. [Accessed: 06-Mar-2015].
- [37] “In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence.” [Online]. Available: <http://www.healthydifferencecalf.com/PDF/AntimicrobialAntiviralComponents.pdf>. [Accessed: 06-Mar-2015].
- [38] P. A, “A Tecnologia do DNA Recombinante e Suas Múltiplas Aplicações.” [Online]. Available: <http://www.webartigos.com/artigos/a-tecnologia-do-dna-recombinante-e-suas-multiplas-aplicacoes/10701/>. [Accessed: 14-Mar-2015].
- [39] M. Dreyer and O. Renn, “Encyclopedia of Food Safety,” *Encycl. Food Saf.*, vol. 3, pp. 13–19, 2014.
- [40] G. Tucker, E. Hanby, and H. Brown, “Development and application of a new time-temperature integrator for the measurement of P-values in mild pasteurisation processes,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 87, no. April, pp. 23–33, 2009.
- [41] H. F. Aguiar and J. a W. Gut, “Continuous HTST pasteurization of liquid foods with plate heat exchangers: Mathematical modeling and experimental validation using a time-temperature integrator,” *J. Food Eng.*, vol. 123, pp. 78–86, 2014.
- [42] M. Gassiot and P. Masoliver, *Case Studies in Novel Food Processing Technologies*. Woodhead Publishing Limited, 2010, pp. 21–33.

- [43] G. Purnell, C. James, and T. Grimsby, *Advances in food surface pasteurisation by thermal methods*. Woodhead Publishing Limited, 2012, pp. 241–273.
- [44] A. C. Ragsdale and S. Brody, “The Colostrum Problem and Its Solution,” *J. Dairy Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 137–144, Mar. 1923.
- [45] J. W. Tyler, J. Lakritz, D. E. Hostetler, V. Douglas, D. M. Weaver, B. J. Steevens, J. Holle, and J. Denbigh, “Effect of pasteurization at 76 and 63 degrees C on the absorption of colostrum IgG in calves,” *J. Dairy Res.*, vol. 67, no. 4, pp. 619–23, Nov. 2000.
- [46] C.-C. Chen and H.-M. Chang, “Effect of Thermal Protectants on the Stability of Bovine Milk Immunoglobulin G,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, no. 9, pp. 3570–3576, Sep. 1998.
- [47] E. Domínguez, M. D. Pérez, P. Puyol, L. Sanchez, and M. Calvo, “Effect of pH on antigen-binding activity of IgG from bovine colostrum upon heating,” *J. Dairy Res.*, vol. 68, no. 3, pp. 511–8, Aug. 2001.
- [48] S.-Q. Li, Q. H. Zhang, Y.-Z. Lee, and T.-V. Pham, “Effects of Pulsed Electric Fields and Thermal Processing on the Stability of Bovine Immunoglobulin G (IgG) in Enriched Soymilk,” *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 4, pp. 1201–1207, May 2003.
- [49] W. L. Hurley and P. K. Theil, “Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk,” *Nutrients*, vol. 3, no. 4, pp. 442–74, Apr. 2011.
- [50] J. Shih, “Microfabricated high-performance liquid chromatography system with closed-loop flow control,” California Institute of Technology Pasadena, CA, 2008.
- [51] V. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, FIFTH EDIT. St. Gallen, Switzerland, 2010.
- [52] T. Hanai, *HPLC: A Practical Guide*. Royal Society of Chemistry, 1999, p. 134.
- [53] E. Buxbaum, *Biophysical Chemistry of Proteins*. 2011.
- [54] O. Mcpolin, *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis*. Ireland, 2009.

- [55] X. Ding, Y. Yang, S. Zhao, Y. Li, and Z. Wang, “Analysis of ??-lactalbumin, ??-lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC,” *Dairy Sci. Technol.*, vol. 91, pp. 213–225, 2011.
- [56] S. G. Sousa, M. D. Santos, L. G. Fidalgo, I. Delgadillo, and J. a. Saraiva, “Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum,” *Food Chem.*, vol. 151, pp. 79–85, 2014.
- [57] R. C. McKellar, S. Liou, and H. W. Modler, “Predictive modeling of lactoperoxidase and ??-glutamyl transpeptidase inactivation in a high-temperature short-time pasteurizer,” *Int. Dairy J.*, vol. 6, pp. 295–301, 1996.
- [58] S. Jain, J. Dass, and H. P. Pati, “Transfusion associated peak in hb HPLC chromatogram - a case report.,” *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 4, no. 1, p. e2012006, Jan. 2012.
- [59] Y. Liang, X. Wang, M. Wu, and W. Zhu, “Simultaneous isolation of lactoferrin and lactoperoxidase from bovine colostrum by SPEC 70 SLS cation exchange resin,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 8, pp. 3764–3776, 2011.
- [60] G. MAINER, L. SANCHEZ, J. M. ENA, and M. CALVO, “Kinetic and Thermodynamic Parameters for Heat Denaturation of Bovine Milk IgG, IgA and IgM,” *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 5, pp. 1034–1038, Sep. 1997.
- [61] J. N. deWit and G. Klarenbeek, “Effects of Various Heat Treatments on Structure and Solubility of Whey Proteins,” *J. Dairy Sci.*, vol. 67, no. 11, pp. 2701–2710, Nov. 1984.
- [62] E. Dominguez, M. D. Perez, and M. Calvo, “Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulins in bovine colostrum.,” *J. Dairy Sci.*, vol. 80, no. 12, pp. 3182–3187, 1997.
- [63] a W. Vermeer and W. Norde, “The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein.,” *Biophys. J.*, vol. 78, no. January, pp. 394–404, 2000.

- [64] N. C. Price, “Conformational issues in the characterization of proteins.,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 31 (Pt 1), pp. 29–40, Feb. 2000.
- [65] F. Fonteh, A. Grandison, and M. Lewis, “Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows and goats milk throughout lactation,” *J. Dairy Res.*, pp. 401–409, 2002.
- [66] J. Quigley, “<http://www.progressivedairy.com/dairy-basics/calf-and-heifer-raising/7016-colostrum-pasteurization-pros-and-cons>,” *Dairy basics*, 2011. [Online]. Available: <http://www.progressivedairy.com/dairy-basics/calf-and-heifer-raising/7016-colostrum-pasteurization-pros-and-cons>. [Accessed: 13-Mar-2015].

ANEXOS

ANEXO A1- Processo térmico das amostras para HPLC

Equipamento de HPLC utilizado no Departamento de Laticínios, Gordura e Cosmética do ICT, Praga, República Checa.



Figura A.1. Equipamento de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Anexo A2- Análise da atividade da lactoperoxidase

As condições utilizadas foram: 25 ° C, pH = 5,5, A436nm, caminho de luz = 1 centímetro

MÉTODO: Taxa de determinação contínua espectrofotométrica

Tabela A.1 Reagentes utilizados no ensaio enzimático da atividade da lactoperoxidase segundo de Kessey, J., 1987 e Putter, J., 1983

A	100 mM de fosfato de potássio, Solução monobásica (Preparou-se 100 mL em água desionizada, utilizando potássio Fosfato, monobásico, anidro. Sigma Prod. No. P- 5379)
B	100 mM Solução de Fosfato de Potássio Dibásico. (Preparou-se 100 mL em água desionizada, utilizando Potássio Fosfato dibásico, Trihidrato. Sigma Prod. No. P- 5504)
C	Solução tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 5,5 à 25 °C (Preparou-se 100 mL, ajustando o pH do Reagente A à 5,5 a 25 °C com Reagente B.)
D	100 mM de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico) Solução de substrato (Preparou-se 30 mL em água desionizada, utilizando ácido 2,2'-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), diamônico, sal. Sigma Prod. No. A-1888) FRESH
E	0,025% (W / W) Solução de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) (Preparou-se 50 mL de água desionizada fria usando peróxido hidrogénio, 30% (w / w). Sigma Prod. No. H-1009) FRESH
F	Solução de Potássio 200 mM Fosfato (Enz Dil) (Preparou-se em 100 mL de água desionizada utilizando fosfato de Potássio, dibásico, Trihidrato. Sigma Prod. No. P- 5504)
G	Solução de Enzima lactoperoxidase. (Imediatamente antes da utilização, preparou-se uma solução que continha 0,15-0,25 unidades/mL de peroxidase em frio do Reagente F.)

PROCEDIMENTO:

Tabela A.2 Quantidade de reagentes utilizados no ensaio enzimático da atividade da lactoperoxidase segunfo de Kessey, J., 1987 e Putter,J.,1983

Reagente	Teste (mL)	Branco(mL)
C	2,20	2,20
D	0,70	0,70
E	0,10	0,10
G	0,05	---
F	---	0,05

Fórmula para o cálculo da atividade da LP:

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\Delta A_{436\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{436\text{nm}}/\text{min Blank}) (3.05) (\text{df})}{(29.3) (0.05)}$$

3.05 = Total volume (in milliliters) of assay

df = Dilution factor

29.3 = Millimolar extinction coefficient⁶ of oxidized ABTS at 436nm

0.05 = Volume (in milliliter) of enzyme used

Anexo A3 - Análise das áreas obtidas nos cromatogramas após tratamento térmico por HPLC.

Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation, da amostra submetida a 55°C durante 30 min.

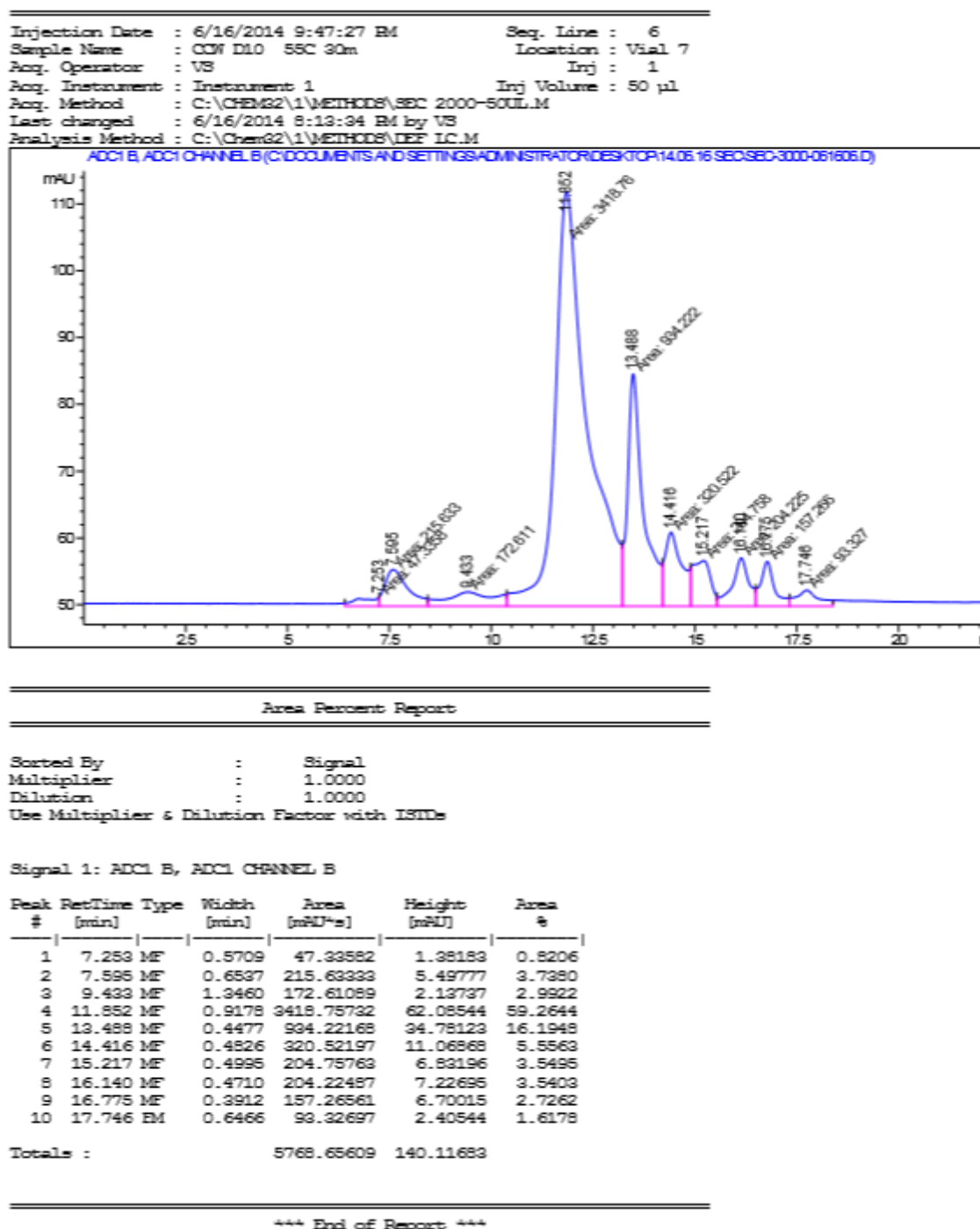


Figura A.1 Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation do HPLC quando a amostra foi submetida a 55°C durante 30 min.

Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation, da amostra submetida a 60°C durante 30 min.

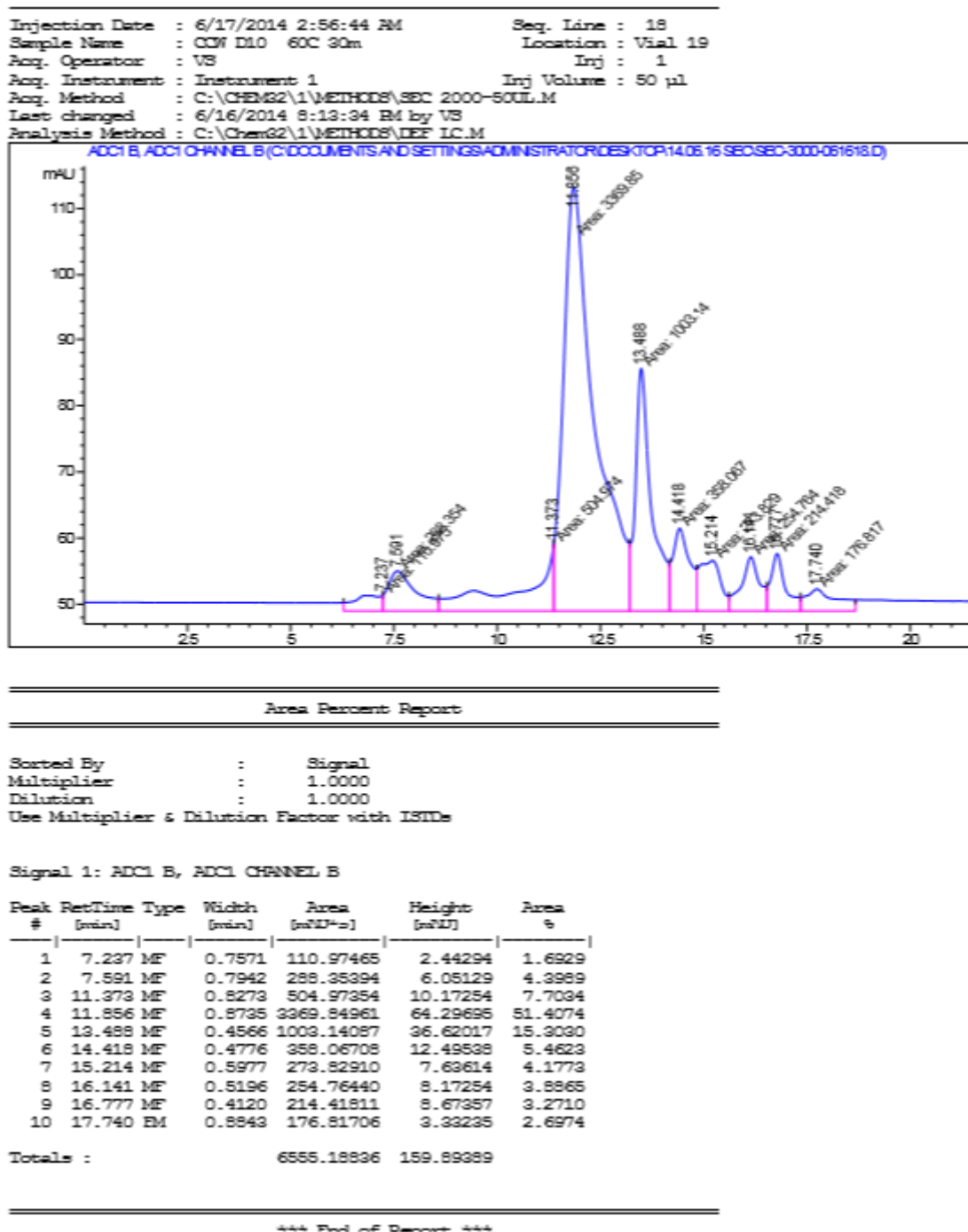


Figura A.2 Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation do HPLC quando a amostra foi submetida a 60°C durante 30 min.

Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation, da amostra submetida a 65°C durante 30 min.

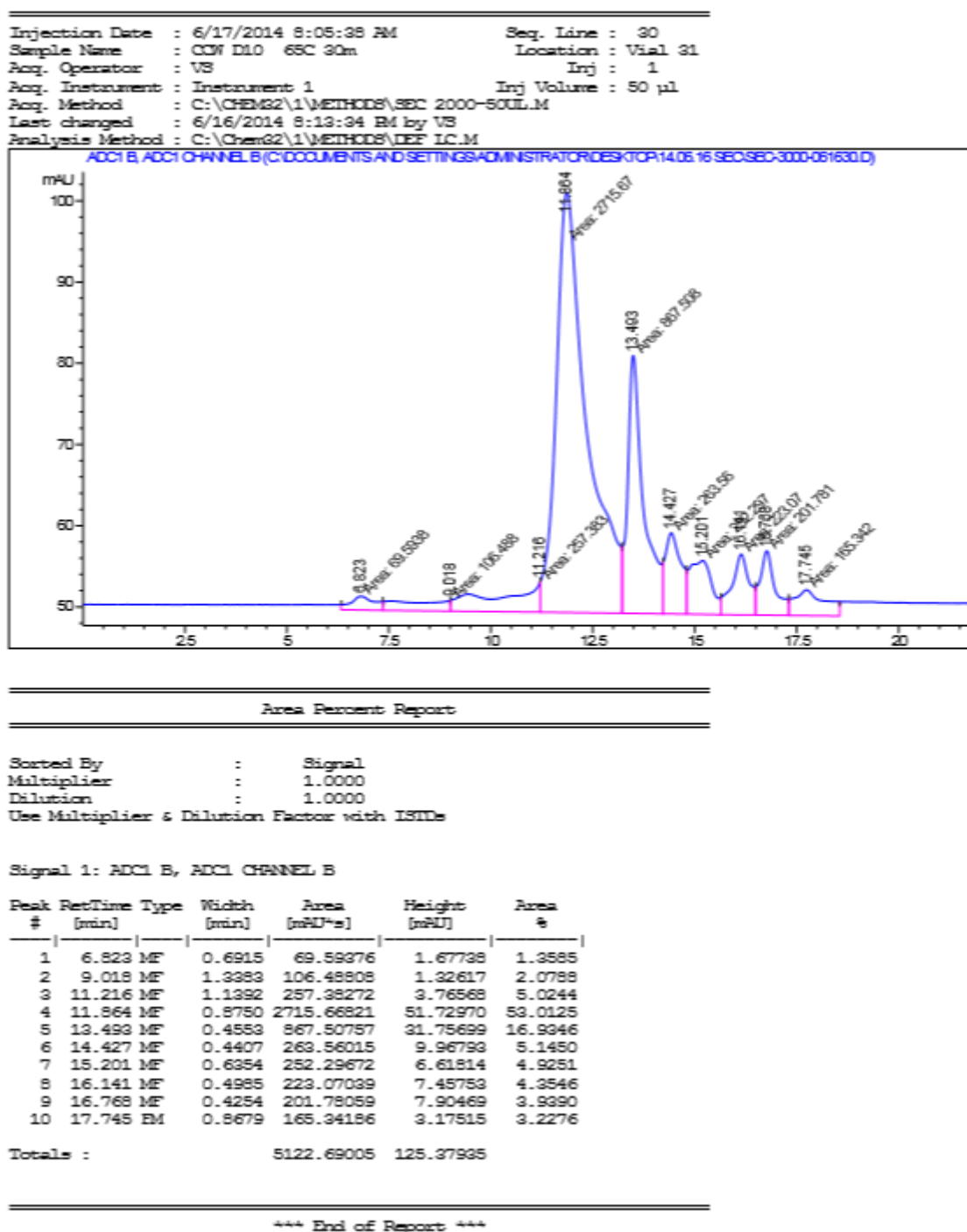


Figura A.3 Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation do HPLC quando a amostra foi submetida a 65°C durante 30 min.

Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation, da amostra submetida a 70°C durante 30 min.

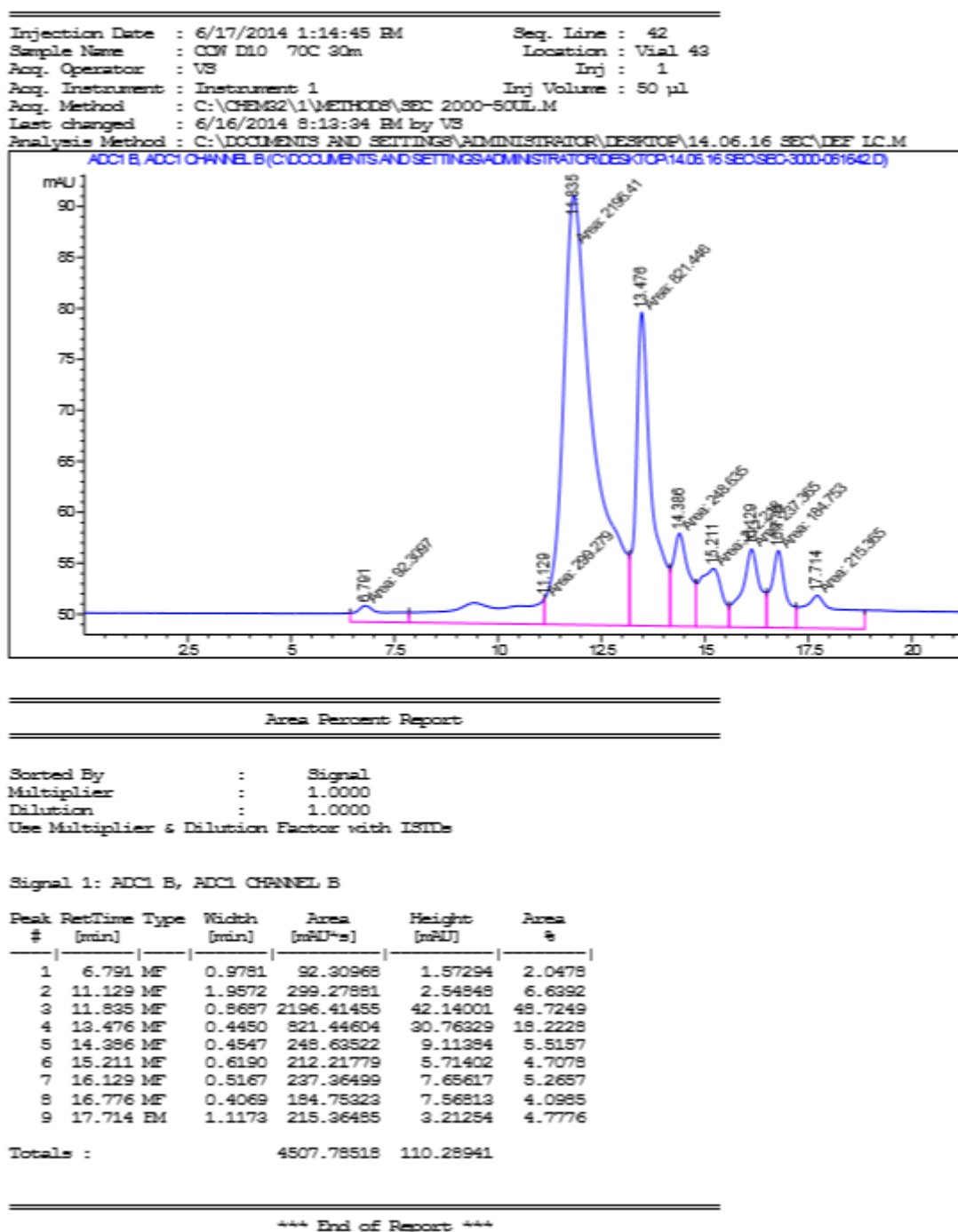


Figura A.4 Relatório efetuado pelo software Agilent ChemStation do HPLC quando a amostra foi submetida a 70°C durante 30 min.