

Liofilização como alternativa para conservação do leite humano

Lyophilization as an alternative for conservation of breast milk

Edlene do Carmo Martins¹, Renata Rodrigues Leonardi², Carlos Rocha Oliveira³,
Fernanda Malagutti Tomé Matsumoto⁴

¹Nutricionista, São José dos Campos-SP, Brasil; ²Farmacêutica, São José dos Campos-SP, Brasil; ³Curso de Farmácia da Universidade Paulista, São José dos Campos-SP, Brasil; ⁴Curso de Nutrição da Universidade Paulista, São José dos Campos-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Os benefícios do aleitamento materno são bem descritos na literatura. Melhorar as condições de fornecimento acessível deste importante alimento a todos os lactentes é um desafio para o profissional nutricionista. **Métodos** – Amostras de leite humano procedentes do Banco de Leite da cidade de Taubaté, São Paulo, foram submetidas à liofilização, sendo congeladas em nitrogênio líquido a -210°C e permanecendo no liofilizador por 24 horas. Após a liofilização as amostras foram analisadas e comparadas ao leite *in natura* quanto a alguns nutrientes: lipídeos por extração direta em extrator Soxhlet, glicídios redutores em lactose por titulação, proteínas por metodologia semimicro de Kjeldahl, cálcio por titulação e imunoglobulinas por eletroforese em gel de agarose com o objetivo de visualizar as bandas gama. Também foram realizadas provas de reconstituição diluindo 30g de cada amostra em 100mL de água filtrada. As análises foram realizadas em triplicata e em seguida analisadas estatisticamente. **Resultados** – As triplicatas analisadas apresentaram os teores de lipídeos, lactose, proteína e cálcio inalterados em comparação aos valores do leite não-lioofilizado descrito na literatura. Quanto à restituição, a cor e a fluidez se mostraram semelhante ao leite *in natura* e a diluição foi plena. A eletroforese também demonstrou a presença da banda gama o que sugere a conservação de imunoglobulina. **Conclusão** – A técnica de liofilização mostrou-se muito favorável em relação a outras técnicas de conservação, já que a mesma não utiliza o aquecimento como fator determinante para diminuir a atividade de água e sim o estado físico da matéria: sublimação.

Descritores: Leite humano; Liofilização

Abstract

Objective – The benefits of breastfeeding have being reported in the literature. The improvement of the accessibility conditions to this important food to all infants is a challenge for the professional nutritionist. **Methods** – Samples of human breast milk were collected from Taubaté city, São Paulo. They were submitted to lyophilization and frozen in liquid nitrogen at -210°C and they were remained in lyophilizer during 24 hours. After the lyophilization, the milk was analyzed and compared with *in natura* milk with respect to the following nutrients: lipids by direct extraction in Soxhlet apparatus, reducing carbohydrates by titration in lactose, protein by semi-micro Kjeldahl methodology, calcium by titration and immunoglobulins by agarose gel electrophoresis in order to visualize the gamma bands. Tests of reconstitution were also carried out by diluting 30 g of dried milk in 100 mL of filtered water. The analyses were performed in triplicate and then analyzed statistically. **Results** – The triplicates analyzed presented levels of lipids, lactose, protein and calcium unchanged in comparison with the values of non-lyophilisate samples as described in the literature. In the restitution tests, the color and the fluidity were similar to *in natura* milk and the dilution was total. The electrophoresis also showed the presence of the gamma bands, that suggests the conservation of the immunoglobulin. **Conclusion** – The results showed that lyophilization process is favorable, compared with other conservation processes, since that is not based in the heating as the main factor to reduce the water activity, but the physical state of matter: sublimation.

Descriptors: Milk, human; Freeze drying

Introdução

Muito se fala sobre a importância do aleitamento materno, conseqüentemente, sobre os benefícios do leite para a prole¹⁻⁴, o qual constitui o primeiro alimento dos mamíferos⁵, suprimindo todas as necessidades nutricionais da espécie a que se destina, bem como fornecendo subsídios para adaptação ao novo meio em que passam a viver pós-parto⁶.

Os bancos de leite nasceram da necessidade de fornecer o leite humano, garantindo seus benefícios ao recém-nascido⁷⁻⁸, quando o aleitamento pela mãe biológica é indispensável. A sistematização da rede de banco de leite é considerada uma das maiores e mais bem preparadas do mundo.

O fornecimento do alimento ideal, com a qualidade de seus nutrientes preservados e a garantia da segurança alimentar aos lactentes e sua família, significa atender a todas as expectativas satisfatórias de uma vida mais saudável⁹.

O uso da tecnologia da liofilização ou a desidratação a frio (*freeze dry*) é um processo confiável de conservação de produtos biológicos, sendo isento de conservantes ou produtos químicos. Na liofilização o leite humano é congelado em temperaturas inferiores a -20°C e submetido à baixa pressão (alto vácuo), fa-

zendo com que a água dos produtos que foi transformada em gelo, sublima, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o gasoso. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água. Desta forma, os produtos liofilizados não sofrem alterações de tamanho, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas, etc. e, quando conservados adequadamente, mesmo a temperatura ambiente, resiste intacto por muitos anos. A legislação brasileira permite dois anos de validade¹⁰. Produtos liofilizados têm baixo peso, pois a maioria dos produtos naturais possui muita água, se conservam mesmo a temperatura ambiente e, quando reconstituídos retornam suas propriedades originais como nenhum outro produto desidratado.

O presente trabalho abre o questionamento para novas opções de melhoramento tecnológico eficaz, que não comprometa o que o leite humano tem de melhor, mas que não exponha o lactente a doenças e microrganismos patogênicos. Provavelmente, o processo de liofilização possa ser uma alternativa para conservação do leite, já que se trata de um processo altamente eficiente, aumentando significativamente o tempo de prateleira do produto e diminuindo a demanda por espaço físico para sua armazenagem.

gem, algo importante para a atual estrutura dos bancos de leite do país.

Métodos

Sendo o leite humano composto cerca de 80% por água, houve a necessidade de adquirir uma grande quantidade de amostras para realização deste estudo, contamos com a doação de 2 litros da amostra de leite do Banco de Leite Humano de Taubaté – SP.

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e protegidas da luminosidade com papel alumínio para evitar a decomposição de moléculas fotossensíveis e consequentemente perda nas propriedades. Foram liofilizadas no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, onde 1 litro de leite foi submetido à liofilização e mais 1 litro utilizado como comparativo nas análises dos valores nutricionais. Foram realizados métodos físico-químicos para averiguação dos teores de lactose, proteínas, lipídios, cálcio, imunoglobulina e teste de precipitação. As análises foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar da Saúde na Universidade Paulista Campi São José dos Campos, de acordo com os procedimentos e Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹¹ (2005). Além disso, a pesquisa realizada foi submetida à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista, sob Folha de Rosto SISNEP nº FR213255 e aprovação sob nº de documento 363/08.

Liofilização

Para ser levada ao liofilizador a amostra deve ser rapidamente congelada. Para isso utilizou-se nitrogênio líquido, colocou-se a amostra até cerca de 1/3 do tubo que é utilizado no liofilizador, e congelou-se, sempre girando o tubo no nitrogênio líquido a fim de que o mesmo congelasse de forma homogênea nas paredes do tubo. Após congelamento total o tubo foi levado ao equipamento – liofilizador, onde permaneceu ligado por 24h. O resultado obtido foi a retirada total da água do leite por sublimação. A amostra foi mantida ao abrigo da luz, envolvendo-se o tubo com papel alumínio. Para os procedimentos de análise de lipídeos, lactose, proteínas e cálcio foram feitas triplicatas da amostra de 1 litro de leite liofilizado.

Determinação do teor de lipídio – Extração direta em Soxhlet

A determinação do teor de lipídios das amostras foi realizada pelo método de Soxhlet do Instituto Adolfo Lutz¹¹. Pesou-se 5g da amostra em cartucho de celulose, levado para o aparelho extrator, adicionou-se o éter etílico em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Adaptou-se a um condensador de bolas. Mantido, sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por 8h (4 a 5 gotas por segundo). Retirou-se o cartucho, o solvente foi evaporado em rotavapor, a uma velocidade de 60 RPM e o banho-maria a uma temperatura de 50°C. Por fim, retirou-se todo o éter etílico e o balão foi pesado. Este procedimento foi realizado em triplicata e, em seguida, calculado o teor de lipídios das amostras.

Determinação de glicídios redutores em lactose

Para a determinação de glicídios redutora em lactose colocou-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica 10 mL da amostra para um balão volumétrico de 100mL, adicionou-se 50 mL de água, 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, misturou-se bem após cada adição. Após 5 minutos de sedimentação, completou-se o volume com água e agitou-se. Filtrou-se com papel filtro. O filtrado límpido colocou-se em um frasco Erlenmeyer de 300mL. Em um balão de fundo chato de 300mL, adicionou-se 10mL de cada uma das soluções Fehling e 40mL de água, aquecendo até ebulição em chapa aquecedora. Transferiu-se o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicionou-se, gota e gota, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre,

até que esta solução mudasse de coloração azul à incolor (presença de resíduo vermelho-tijolo no fundo do balão). Finalmente, determinou-se o teor de glicídios redutores em lactose¹¹.

Determinação do teor de proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método semimicro de Kjeldahl convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25¹¹. Para isso, após digestão das amostras, acoplou-se a amostra em aparelho de destilação, onde se acrescenta um excesso de hidróxido de sódio (10 mL a 60%), sob aquecimento da manta aquecedora. A amônia em meio básico passa para a forma NH₃ (volátil), e pode ser destilada e recolhida em solução ácida. Recolhe-se o destilado em uma solução e ácido bórico com 2 a 4 gotas de solução indicadora (vermelho de metila + azul de metileno). Fez-se titulação direta com ácido clorídrico 0,02 N. Em seguida, calculou-se o teor de proteína na amostra.

Determinação do teor de cálcio no leite em pó

Preparou-se a bureta de 50mL com solução padronizada de EDTA. Pesou-se duas amostras de leite humano liofilizado, com 1,0025g e 1,0005g, respectivamente, em béqueres de 100mL, limpos e secos. O conteúdo de ambos os béqueres, transferiu-se para o Erlenmeyer de 250mL, com o auxílio de cerca de 50mL de água destilada. Agitou-se cuidadosamente até completa dissolução de leite em pó, evitou-se qualquer quantidade da amostra fique aderida às paredes da vidraria. Adicionou-se 15 mL da solução tampão de pH 10, alguns cristais de KCN, para mascarar íons de Zn⁺², Cu⁺² e Fe⁺³, que podem estar presentes à amostra e que interferem na análise complexando-se principalmente ao indicador. Homogenizou-se a solução contida no Erlenmeyer. Adicionou-se 20 gotas da solução do complexo [Mg-EDTA]⁺² e 10 gotas da solução do indicador negro de eriocromo. Realizou-se a titulação, escoado lentamente a solução titulante de EDTA sobre a titulada, com constante agitação, até que a coloração tornasse azul. Por fim, determinou-se o teor de cálcio na amostra¹¹.

Proteinograma – Imunoglobulina

Foi aplicado o leite humano reconstituído, no suporte eletroforético (gel de agarose), que foi transferido para a cuba de eletroforese com tampão barbital (pH 8,6). A cuba de eletroforese foi ligada à fonte e mantido o procedimento por 20 minutos. Após este período foi desligada a fonte e removeu-se o suporte. Eliminou-se o excesso de tampão das bordas do suporte. Mergulhou-se o suporte em 200mL de corante (negro de amido) por 5 minutos sem agitação, que foi retirado e colocado em 200 mL de descorante por 5 minutos. Foi seco até a desidratação por completo do gel, sendo utilizado um secador na potência máxima. Quando seco, o gel retornou a solução descorante até que o fundo ficasse transparente. Secou-se novamente até a desidratação completa do gel e observou-se os resultados¹¹.

Prova de reconstituição

Foram diluídas em 100 mL de água filtrada, duas colheres de sopa do leite liofilizado (30g). Observou-se durante 12h se o produto manteve-se como leite fluido, isto é, estável sem precipitação.

Análises estatísticas

Para determinar o teor dos componentes presentes no leite liofilizado, os resultados obtidos das determinações analíticas, em triplicata, foram submetidos à análise de variância ANOVA e a diferença estatística das medias pelo Teste de Tukey com 5% de significância, utilizando o programa Origin versão 6.0.

Resultados

Foram realizadas as análises de determinação dos teores de lipídio, lactose, proteína e cálcio e que apresentaram os seguintes resultados mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação dos teores de lipídio, lactose, proteína e cálcio das amostras liofilizadas

Nutrientes	Amostras			Média (±)	Leite não-liofilizado (*)
	1	2	3		
Lipídio (g/dL)	3,66	3,43	3,27	3,45 + 0,19	3,8
Proteína (g/dL)	1,15	1,21	1,05	1,14 + 0,08	1,2
Cálcio (mg/dL)	26,1	29,4	28,2	27,9 + 1,67	28-33
Lactose (g/dL)	6,40	8,90	7,01	7,44 + 1,30	7,0

(*) Adaptado de Calil¹² (1991); Silva¹⁴ (2007)

Após as análises dos teores de nutrientes do leite liofilizados, foram verificadas as características quanto à reconstituição do leite liofilizado, entre elas a cor, a fluidez e aparência. Estas características estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características observadas após a realização da prova de reconstituição do leite liofilizado

Prova de reconstituição	Característica
Cor	Semelhante ao leite não-liofilizado
Fluidez	Semelhante ao leite não-liofilizado
Diluição	Plena, sem formação de precipitados

Em relação ao perfil eletroforético das proteínas do leite, realizou-se um proteinograma com o objetivo de visualizar as bandas de imunoglobulinas. Conforme indica a Figura 1, a banda referente à imunoglobulina A (IgA) é bem visível, indicando que o processo de liofilização mantém presente no leite esta imunoglobulina.

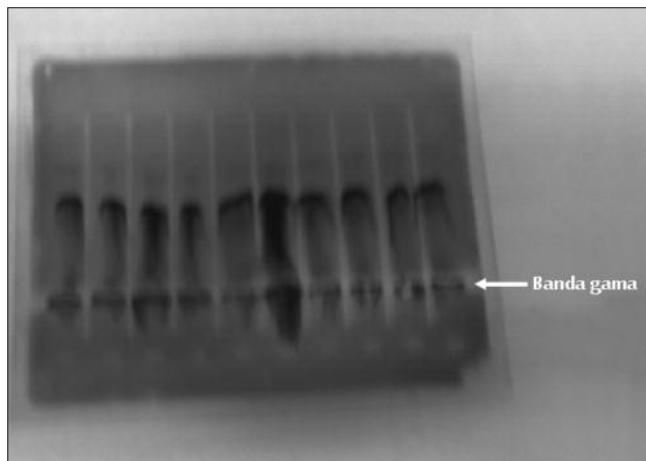


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o perfil eletroforético das amostras de leite liofilizado. A seta indica a banda gama das proteínas confirmando a presença de imunoglobulinas

Discussão

O método de liofilização sugere uma técnica que permite a conservação de materiais biológicos por pelos menos dois anos e mostrou-se viável, já que retirou com sucesso toda água e manteve o produto sem alterar a composição química desse alimento.

O leite humano é, sem dúvida, a principal fonte de alimento para o bebê e uma das mais importantes para o homem. A complexa e bem elaborada composição deste alimento, tem como objetivo fornecer em quantidades balanceadas, a energia e os nutrientes necessários. O método de liofilização, que visa reduzir a atividade de água, torna este alimento um produto de baixo peso, com as características sensoriais mantidas. Sua reconstituição é outro ponto favorável, já que para isto, não envolve nenhuma técnica complicada: é a simples adição de água.

Os lipídeos constituem a maior fonte de energia do leite humano. Seu conteúdo varia entre 3 e 4 g/dL, correspondendo a, aproxima-

damente, 40 a 50% do total calórico; já o colostro possui concentração lipídica menor, em torno de 1,8 a 2,9 g/dL¹². Em relação ao teor de gordura do leite humano, os triglicérides constituem cerca de 98%, sendo a digestão e absorção dos mesmos crucial para o crescimento e desenvolvimento do lactente¹³.

Deste modo, os lipídeos, principal fonte calórico-energética do leite humano e a fração mais variável da sua composição, podendo variar em função do período de lactação, mamada, etc., tiveram seus teores determinados a partir da extração direta em Soxhlet, um procedimento que envolve sucessivas lavagens do leite (liofilizado) com éter, onde o solvente arrasta os lipídios que se encontram nas amostras. Neste sentido, a técnica demonstrou que o teor de gordura do leite, mesmo sendo submetido ao processo de liofilização, encontrou-se próximo aos teores descritos na literatura¹⁴⁻¹⁶.

Outra importante classe de nutrientes do leite são as proteínas. Cerca de 6 a 7% da energia do leite humano é fornecida através das proteínas nele encontradas, podendo ainda ser agrupadas em proteínas do soro e as caseínas¹⁷. O método utilizado demonstrou a presença de proteínas em quantidades aceitáveis. O que indica que durante o processo de liofilização não houve perdas deste macronutriente.

Além do ponto de vista energético, de acordo com Machado¹⁸ (2002), o leite materno apresenta propriedades antinfeciosas, principalmente em relação à diarreia. Ainda de acordo com Machado¹⁸ (2002), os principais constituintes do leite humano, que atuam como agente de proteção no organismo do lactente são as imunoglobulinas (ex.: IgA, IgG, IgM, etc.), além de macrófagos, linfócitos, lactoferrina, entre outros. O perfil eletroforético das bandas de proteínas, incluindo a faixa gama das imunoglobulinas, correu significativamente. Atestando sua permanência no leite mesmo liofilizado. Assim, a permanência das IgA após o processo de liofilização, mostrou-se uma alternativa viável para fornecer o que de melhor e mais significativo o leite materno tem para fornecer ao lactente. É o único componente que realmente difere o leite humano de outros, e até mesmo dos elaborados em laboratórios.

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, suprimindo cerca de 40% das necessidades energéticas do recém-nascido¹⁷⁻¹⁸. Sua presença no leite liofilizado é considerável comparando com o leite não liofilizado, embora os resultados aparentemente sugiram uma maior quantidade deste açúcar no leite liofilizado. Este fato pode ser explicado, ao menos em parte, devido a quantidade de amostra utilizada, ou seja, 2g, provavelmente concentrando muito a solução. Seja como for, o dado importante é que foi observada a manutenção dos teores de lactose, permitindo sugerir que o processo de liofilização não produz perda considerável de lactose.

O leite humano contém quantidade apreciável de cálcio, fósforo, potássio, sódio, magnésio e cloreto e possui pequenas quantidades de ferro, cobre e manganês. No leite humano os minerais estão presentes em uma forma altamente biodisponível¹⁹. A presença de íons cálcio no procedimento é evidente. Os valores do teor de íons Ca⁺² das amostras comparadas com o da literatura, apresentaram-se semelhantes podendo ser verificada a manutenção deste importante mineral.

No procedimento utilizado para reconstituição pôde-se verificar se no leite, após liofilização, foi possível constatar diluição total, sem a presença de precipitação.

Conclusão

O processo de liofilização para leite materno ainda é um processo pouco estudado e referenciado na literatura em geral, porém é um processo que se mostrou muito promissor no presente trabalho.

Obteve-se uma grande quantidade de leite liofilizado, e as análises realizadas mostraram resultados positivos, já que em todas as análises feitas mostrou-se a permanência dos nutrientes, demonstrou-se que as propriedades não foram alteradas pelo processo de liofilização. E que suas condições favoráveis para reconstituição, facilitam, inibem a contaminação microbiológica e garantem maior disponibilidade para armazenamento deste material. O que facilit-

taria sobre maneira o fornecimento deste alimento tão rico e completo nos Bancos de Leite Humanos espalhados pelo Brasil.

Sugere-se assim, trabalhos de continuidade nesta linha de pesquisa, que visa estudar ainda mais as propriedades nutricionais, microbiológicas e a viabilidade econômica do processo, bem como a aplicabilidade da técnica para Bancos de Leite.

Referências

1. Accioly E, Saunders C, Lacerda EM. A nutrição em obstetrícia e pediatria. 3ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2003. p.286-9.
2. Barnard J. Gastrointestinal disorders due to cow's milk consumption. *Pediatr Ann.* 1997;26(4):244-50.
3. Dewey K, Heinig M, Nommsen-Rivers L. Differences in morbidity between breastfed and formula-fed infants. *J Pediatr.* 1995;126 (5 Pt 1):696-702.
4. Fomon SJ. Human milk and breast milk. *In: Fomon SJ, editor. Nutrition of normal infants.* Saint Louis: Mosby; 1993. p.409-23.
5. Tortora GJ. Corpo humano, fundamentos de anatomia e fisiologia. 4ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. p.563-8.
6. Mepham TB, editor. *Physiology of lactation.* Philadelphia: Open University Press; 1987. p.2-10.
7. Goldman AS, Garza C. Future research in human milk. *Pediatr Res.* 1987; 22:493-6.
8. Shepherd R. Energy expenditure in infants in health and disease. *Can J Gastroenterol.* 1997;11(1):101-4.
9. Worthington-Roberts BS, Williams SR, editors. *Nutrition in pregnancy and lactation.* 5ª ed. St. Louis: Mosby; 1993. p.347-401.
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria MS 322/88. Normas para implantação e funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 maio 1988.
11. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005.
12. Calil VMLT, Leone CR, Ramos JLA. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. *Pediatrics (São Paulo).* [periódico na Internet]. 1992 [acesso 10 jan 2010]; 14:14-23. Disponível em <http://www.pediatrasiapaolo.usp.br/upload/pdf/83.pdf>
13. Andersson Y, Savman, K, Blackberg L, Hernell O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2007;96:1445-9.
14. Silva RC, Escobedo JP, Gioielli LA, Quintal VS, Ibdidi SM. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quim Nova.* 2007;30(7):1535-8.
15. Cavalcante JLP, Telles FJS, Peixoto MMLV, Rodrigues RCB. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005;25(1):103-8.
16. Vieira AA, Moreira MEL, Rocha AD, Pimenta HP, Lucena SL. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. *J Pediatr.* 2004;80(6):490-4.
17. Trahms CM. Nutrição na lactância. *In: Mahan LK, Stump SE. Alimentos, nutrição e dietoterapia.* São Paulo: Roca; 2002. p.187-204.
18. Machado MMT. Fatores de proteção do leite humano. *Rev Pediatr Ceará.* 2002;3(2):56-63.
19. Carmo MGT, Colares LGT, Saunders C. Nutrição na lactação. *In: Accioly E, Saunders C, Lacerda EMA, editores. Nutrição em obstetrícia e pediatria.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2004. p.225-46.

Endereço para correspondência:

Fernanda Malagutti Tomé Matsumoto
Rua Bertolino Cezário dos Santos, 122 – Bosque dos Eucaliptos
São José dos Campos-SP, CEP 12233-180
Brasil

E-mail. fmtome@gmail.com / croliv@usp.br

Recebido em 14 de fevereiro de 2011
Aceito em 21 de março de 2011