



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

OSNEY MASSAMI INAY

**USO DA LACTOFERRINA COMO PROMOTORA DE  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM QUEIJO  
MINAS FRESCAL**

---

Londrina  
2012

OSNEY MASSAMI INAY

**USO DA LACTOFERRINA COMO PROMOTORA DE  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM QUEIJO  
MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Casale Aragon Alegro

LONDRINA  
2012

OSNEY MASSAMI INAY

**USO DA LACTOFERRINA COMO PROMOTORA DE  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM QUEIJO  
MINAS FRESCAL**

Dissertação aprovada em 05 de junho de 2012, pela banca  
examinadora constituída pelos professores:

---

**Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro  
Universidade Norte do Paraná**

---

**Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**

---

**Profa. Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza  
Universidade Norte do Paraná**

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro, pelo incentivo e, acima de tudo, por partilhar seus conhecimentos, pela força, e por acreditar em mim. Sua iluminação me orientou, me fez desenvolver este trabalho com segurança e tranquilidade;

Ao meu amigo Alisson Santana, colaborador em todos trabalhos realizados e um grande amigo.

Ao técnico de laboratório Jorge Donato, mais do que um colaborador competente, um grande amigo;

À Profa. Ms Beatriz Lourenço Venegas Ulate, uma pessoa que me incentivou muito para as minhas conquistas;

À Profa. Marilsa Suemi Sakamoto Santini, outra pessoa que incentivou minhas conquistas;

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta realização;

À minha mãe, que sempre me deu força, que esteve ao meu lado em todos os momentos, mesmo estando em outro país, me forçando e incentivando ao melhor.

Há ao menos duas maneiras básicas de conseguir sucesso na vida.  
Ou você possui um talento excepcional em alguma área de atividade e explora isso,  
ou você segue o caminho comum e correto de disciplina, estudo, esforço, humildade,  
privações e trabalho para conseguir o que deseja.  
Em qualquer uma delas, não existem sonhos se realizando da noite para o dia.  
Nenhuma árvore nasce, cresce e oferece frutos instantaneamente. Tudo demanda  
trabalho, paciência e dedicação.  
E também não existe sorte. O que existe é estar no lugar certo, na hora certa - mas  
não por coincidência, mas por estar ativo no jogo!  
Não existe essa estória de marcar um gol estando no banco de reservas.  
Você tem que estar em campo, chamando o jogo pra si, tomando a responsabilidade  
por si próprio, de quem faz a própria vida, e de quem não espera, mas faz acontecer.

Augusto Branco

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a ação da lactoferrina sobre a multiplicação de *Lactobacillus casei in vitro* e em queijo Minas frescal. Curvas de crescimento de *L. casei* em caldo BHI contendo 1 mg/mL e 2 mg/mL de lactoferrina foram realizadas. Além disso, queijos Minas frescal adicionados de *L. casei* e lactoferrina (2 mg/g e 4 mg/g) e somente com *L. casei* (controle) foram produzidos e armazenados a 4 °C, durante 28 dias. Os queijos foram analisados quanto ao pH, acidez titulável e enumeração de *L. casei* e de microrganismos psicrotóxicos nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 e quanto à composição centesimal, no dia 1. O experimento foi repetido três vezes, e os dados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey, no nível de 5% de significância. A multiplicação de *L. casei* foi estimulada pela lactoferrina no teste *in vitro*, na concentração de 2 mg/mL, porém essa ação não foi verificada no queijo, mesmo quando adicionado 4 mg/g de lactoferrina. A população de microrganismos psicrotóxicos nos queijos contendo lactoferrina não diferiu da presente no queijo controle, demonstrando que a ação antimicrobiana da proteína também não foi verificada no alimento. Mais estudos devem ser realizados, avaliando-se estas ações da lactoferrina em alimentos, uma vez que eles apresentam mais variáveis que podem afetar a ação desta proteína, comparando-se com os testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** leite, compostos bioativos, antimicrobianos natural, probiótico.

## ABSTRACT

This work evaluated the action of lactoferrin on the multiplication of *Lactobacillus casei* *in vitro* and in fresh cheese. Growth curves of *L. casei* in BHI broth containing 1 mg/mL and 2 mg/mL of lactoferrin were performed. Additionally, Minas frescal cheeses added of *L. casei* and lactoferrin (2 mg/g and 4 mg/g) and only with *L. casei* (control) were produced and stored at 4 °C during 28 days. Cheeses were analyzed for pH, titratable acidity and enumeration of *L. casei* and psychotropic microorganisms in days 1, 7, 14, 21 and 28 and for the centesimal composition in day 1. The experiment was repeated three times, and data were analyzed by ANOVA and Tukey test, with an overall risk level of 5%. When tested *in vitro*, *L. casei* multiplication was stimulated by lactoferrin, at a concentration of 2 mg/mL, but this action has not been verified in the cheese, even when added 4 mg/g of lactoferrin. Psychotropic population observed in cheeses containing lactoferrin did not differ from the present in the control one, demonstrating that the antimicrobial action of this protein has not been verified also in the food. More studies should be performed, evaluating these effects of lactoferrin in foods, since they have more variables that can affect the action of this protein, comparing to *in vitro* tests.

**Key-words:** milk, bioactives compounds, natural antimicrobial, probiotic.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Proteínas do leite bovino.....	11
2.2 Lactoferrina.....	12
2.2.1 Lactoferrina como agente antimicrobiano.....	13
2.2.2 Lactoferrina como promotora de crescimento de microrganismos probióticos.....	14
3 ARTIGO.....	17
4 CONCLUSÃO.....	38
5 REFERÊNCIAS.....	39



## 1 INTRODUÇÃO

O interesse por produtos alimentícios saudáveis e nutritivos tem crescido mundialmente, o que tem direcionado alguns grupos de pesquisa ao estudo das propriedades funcionais dos produtos lácteos. A descoberta das aplicações nutricionais e funcionais das proteínas do soro do leite promoveu este soro, de subproduto a co-produto, na produção de leite e seus derivados (OLIVEIRA, et al. 2002). O soro do leite é composto por glicomacropéptídeos, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase e peptídeos (U.S. Dairy Export Council, 1997).

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína ligadora de ferro, pertencente à família da transferrina; está presente em diversas secreções como o leite, a lágrima, a saliva e pode ser encontrada predominantemente nos produtos de excreção das glândulas exócrinas dos sistemas digestório, respiratório e reprodutivo. Ela é um monômero de 80 kDa, dividido em dois lobos, que são interligados por uma alfa hélice. Possui dois sítios de ligação de ferro, responsáveis por seqüestrar este íon do meio, tornando-o indisponível para as bactérias (JENSSEN; HANCOCK, 2009).

Essa proteína é conhecida por suas diversas funções biológicas, tais como imunomodulação, regulação do crescimento celular, função antitumoral, atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (WARD et al., 2002). A atividade antimicrobiana foi a primeira função da lactoferrina a ser descoberta (REITER; ORAM, 1967; ARNOLD; COLE; MCEGHEE, 1977; REITER, 1978). No entanto, a lactoferrina não só inibe o crescimento de várias bactérias patogênicas e deteriorantes, mas também estimula a multiplicação de outros tipos de bactérias, como as probióticas (KIM et al., 2005).

Os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Sanders, 2003), como, por exemplo, controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, de

bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

A combinação lactoferrina e probióticos visa possibilitar a sobrevivência e multiplicação da bactéria probiótica no alimento e nas condições do meio gástrico, além do controle da microbiota deteriorante e/ou patogênica que pode estar presente no alimento.

Sendo assim, o emprego da lactoferrina em produtos lácteos abre uma grande perspectiva para a possibilidade de produção de alimentos otimizados, seguros microbiologicamente, com maior vida-de-prateleira, capazes de promover a saúde do hospedeiro e garantir a viabilidade dos probióticos no alimento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO

O leite é uma mistura de componentes derivados de precursores da alimentação e do metabolismo animal, secretada pelas glândulas mamárias (GONZÁLEZ; DURR; FONTANELI, 2001). Segundo Walstra, Woulters e Geurts (2006), os principais constituintes do leite são: água (87,5%), lipídios (3,6%), proteínas (3,0%), lactose (4,6%) e sais minerais (0,7%).

Além de sua finalidade nutricional, o leite contribui também para uma série de funções fisiológicas, sendo a de proteção gastrointestinal, provavelmente, a mais importante. A maioria dessas funções de proteção tem como base suas proteínas e peptídeos, os quais são originados, em grande parte, durante a hidrólise enzimática ocorrida durante a digestão (FOX; McSWEENEY, 2003).

As proteínas do leite podem ser divididas em caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam cerca de 80% do total protéico e precipitam quando se acidifica o leite até pH 4,6. As proteínas do soro, que somam 20% do total, permanecem solúveis neste pH. Distinguem-se quatro tipos de caseínas, conhecidas como frações:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas. As proteínas do soro compreendem, principalmente,  $\beta$ -lactoglobulina (50,8%),  $\alpha$ -lactoalbumina (19,1%), soroalbumina (6,3%), imunoglobulinas (12,7%) e lactoferrina (1,6%) (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOULTERS; GEURTS, 2006).

A bioatividade de inúmeros compostos do leite tem sido demonstrada. Dentre eles, proteínas e peptídeos fisiologicamente importantes incluem imunoglobulinas, lactoferrina, enzimas, inibidores enzimáticos, fatores de crescimento, hormônios e agentes antibacterianos (FOX; McSWEENEY, 2003).

## 2.2 LACTOFERRINA

A lactoferrina é uma glicoproteína monomérica, ligadora de ferro, da família transferrina, com massa molecular de aproximadamente 80 kDa (ANDERSON et al., 1987). A afinidade da lactoferrina por ferro é 260 vezes maior do que a transferrina presente no sangue (BAKER; BAKER, 2005).

O leite é a principal fonte de lactoferrina. Ela é encontrada abundantemente no colostro de bovinos, em concentrações de 7 mg/mL (LONNERDAL; IYER, 1995), diminuindo ao longo da lactação para 0,2 a 1,5 mg/mL (MARSHALL, 2004; FONSECA; SANTOS, 2000). No leite bovino mastítico, a concentração de lactoferrina se eleva, podendo chegar a 10 mg/mL (FONSECA; SANTOS, 2000).

A lactoferrina bovina, em seu estado natural, é parcialmente saturada com ferro (15 - 20%) e apresenta coloração rosa salmão, cuja intensidade depende do grau de saturação de ferro. A lactoferrina que contém menos de 5% de saturação de ferro é chamada apo-lactoferrina, enquanto que saturada de ferro é referida como holo-lactoferrina.

Segundo Garofalo e Goldman (1999), a lactoferrina *in vitro*, exerce atividade bactericida, bacteriostática e fungicida, em sinergismo ou não com outros componentes antibacterianos do leite, como a lisozima (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001; SGARBIERI, 2004).

Durante muito tempo, acreditou-se que esse era o único mecanismo de ação antimicrobiana da lactoferrina (YAMAUCHI et al., 1993). Porém, pesquisas demonstraram que ela também possui ação bactericida ferro-independente, por ligar-se diretamente à parede de bactérias.

Outras funções também foram atribuídas à lactoferrina, tais como imunomodulação, regulação do crescimento celular, função antitumoral, atividade antioxidante e anti-inflamatória (WARD; URIBE-LUNA; CONNEELEY, 2002; RODRIGUES; TEIXEIRA, 2007), agente antiviral, antiparasitário e antifúngico (NABET; LINDEN, 2001; JENSSEN; HANCOCK, 2009). Além disso, essa proteína age na agregação de bactérias e ativação de células fagocíticas (TENOVU, 1989; FARNAUD; EVANS, 2003) e na promoção de crescimento de osteoblastos (NAOT et al., 2005).

### 2.2.1 Lactoferrina como antimicrobinano

Dentre todas as funções biológicas da lactoferrina, a atividade antimicrobiana tem sido a mais investigada (FARNAUD; EVANS, 2003).

A lactoferrina, bem como seu peptídeo derivado, a lactoferricina, inibe a proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em virtude de sua habilidade de sequestrar o ferro disponível no ambiente, privando os microrganismos desse nutriente que é essencial para o seu crescimento (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001; SGARBIERI, 2004).

Além disso, estudos demonstraram que, na superfície dessa proteína existem certas regiões catiônicas que facilitam sua interação com lipídeo A, que é um componente dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de bactérias Gram-negativas. Essa interação modifica a permeabilidade da parede celular das bactérias, fazendo com que ocorra a liberação da porção LPS, provocando o colapso da bactéria (ELLISON; GIEHL; LAFORCE, 1988; APPELMELK et al., 1994).

O efeito bactericida da Lf nas bactérias Gram-positivas é, provavelmente, semelhante ao das Gram-negativas. Os peptídeos ligam-se às bactérias Gram-positivas através de interações eletrostáticas com a matriz lipídica, que apresenta carga negativa (VALENTI; ANTONINI, 2004).

A ação antimicrobiana da Lf tem sido bastante estudada em meio de cultura, mas poucos trabalhos foram feitos avaliando-se esta ação em alimentos lácteos, como pode ser verificado a seguir.

Quintieri et al. (2012) avaliaram a ação da lactoferrina bovina hidrolisada pela pepsina (LFH) sobre a microbiota natural presente em três queijos mussarela comerciais (A, B e C), armazenados a 4 °C durante sete dias. Os autores observaram que a atividade inibitória da LFH depende principalmente da população bacteriana estudada, mas também da amostra analisada. Na amostra A, não houve diferença entre nas populações de mesófilos e *Pseudomonas* presentes nos queijos controle e adicionados de LFH nas concentrações de 0,4 mg/mL e 2 mg/mL. Porém, verificou-se sua ação antimicrobiana em relação aos coliformes, sendo que a maior

concentração testada apresentou efeito em menor período de tempo. Na amostra B, pelo menos em algum período, todos os microrganismos foram inibidos pela LFH. Somente os coliformes não foram inibidos na amostra C.

A atividade antimicrobiana da Lf em queijo cottage contaminado artificialmente com *Escherichia coli* foi avaliada por Kenjin (2002). O autor comparou as populações de *E. coli* em três queijos: controle, adicionado de Lf nativa e adicionado de Lf glicosilada. Ele verificou aumento das populações em todos os queijos, que ficaram armazenados a 15 °C, durante nove dias, sendo que, a partir do sexto dia, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os incrementos da concentração de *E. coli* nos queijos, durante o período de armazenamento foram de aproximadamente 1,5, 2 e 1 ciclos logarítmicos, nos queijos controle, com Lf nativa e com Lf glicosilada, respectivamente. Os resultados mostraram que a molécula da Lf nativa não foi eficiente no controle da *E. coli* no queijo. Porém, esta proteína, quando glicosilada, apresentou efeito antimicrobiano.

### 2.2.2 Lactoferrina como promotora de crescimento de microrganismos probióticos

A lactoferrina também tem sido relatada como promotora de crescimento de alguns tipos de bactérias, como as probióticas.

Probióticos são “microrganismos vivos que, quando utilizados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003), sendo *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* os gêneros bacterianos mais utilizados em alimentos lácteos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; JIM; MARQUART; ZHAO, 2000; ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001).

Dentre os benefícios proporcionados pelos probióticos, encontram-se: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da

produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo apresente entre  $10^8$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do probiótico utilizado, referente à quantidade de microrganismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g de produto que contenha entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005). Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (SAAD, 2006).

De acordo com Coppa et al. (2006), a lactoferrina presente no leite materno mantém a predominância de bactérias que necessitam de baixas concentrações de ferro, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino da criança. Apesar do mecanismo de ação da Lf, nesse caso, não estar ainda elucidado (COPPA et al., 2006), sugere-se que essa atividade estimulatória da Lf esteja relacionada com a presença de proteínas ligadoras de lactoferrina na superfície da membrana bacteriana (KIM et al., 2004).

Desse modo, a Lf pode ser uma alternativa para a aquisição de ferro pela bactéria, se esta última apresentar receptores de membrana externos capazes de se ligar especificamente com o complexo Lf-ferro, o que resulta na internalização do metal (MODUN et al., 2000; KIM et al., 2004). De acordo com Bezkorovainy e Topouzian (1981), o requerimento de ferro pela bactéria é cepa-dependente e a promoção da multiplicação provocada pela lactoferrina é heterogênea entre as diferentes cepas.

Vários autores avaliaram a promoção da multiplicação de microrganismos probióticos pela Lf em meio de cultura (GRIFFITHS et al., 2003; KIM et al., 2004; RAHMAN et al., 2010; TIAN et al., 2010). Trabalhos avaliando-se a ação da lactoferrina em queijos já foram realizados, objetivando-

se avaliar a atividade antimicrobiana desta proteína (KENJIN, 2002; QUINTIERI et al., 2012), mas não a sua capacidade de promover o crescimento dos probióticos. Sendo assim, este é um trabalho pioneiro na área, de grande importância para a indústria de laticínios.



### 3 ARTIGO

#### **Ação da lactoferrina na multiplicação de *Lactobacillus casei in vitro* e em queijo Minas frescal**

Osney Massami INAY<sup>1</sup>, Alisson Santana da SILVA<sup>2</sup>, Edson Renato HONJOYA<sup>3</sup>, Nataly Simões BANDIERA<sup>4</sup>, Elsa Helena Walter de SANTANA<sup>5</sup>, Marcela de Rezende COSTA<sup>6</sup>, Lina Casale ARAGON-ALEGRO<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: ozinay@hotmail.com.

<sup>2</sup>Graduando do curso de Biomedicina, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: alissonsantana57@hotmail.com.

<sup>3</sup>Graduando do curso de Nutrição, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: brother\_eds@hotmail.com.

<sup>4</sup>Farmacêutica pela Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: naty\_bandiera@hotmail.com.

<sup>5</sup>Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com.

<sup>6</sup>Médica veterinária, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, docente da Universidade Federal de Mato Grosso de Sul. Av. Senador Filinto Müller, 2443, Cidade Universitária, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: marcela.rezende@ufms.br.

<sup>7\*</sup>Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG:

26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora  
pra correspondência)

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a ação da lactoferrina sobre a multiplicação de *Lactobacillus casei in vitro* e em queijo Minas frescal. Curvas de crescimento de *L. casei* em caldo BHI contendo 1 mg/mL e 2 mg/mL de lactoferrina foram realizadas. Além disso, queijos Minas frescal adicionados de *L. casei* e lactoferrina (2 mg/g e 4 mg/g) e somente com *L. casei* (controle) foram produzidos e armazenados a 4 °C, durante 28 dias. Os queijos foram analisados quanto ao pH, acidez titulável e enumeração de *L. casei* e de microrganismos psicotróficos nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 e quanto à composição centesimal, no dia 1. O experimento foi repetido três vezes, e os dados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey, no nível de 5% de significância. A multiplicação de *L. casei* foi estimulada pela lactoferrina no teste *in vitro*, na concentração de 2 mg/mL, porém essa ação não foi verificada no queijo, mesmo quando adicionado 4 mg/g de lactoferrina. A população de microrganismos psicotróficos nos queijos contendo lactoferrina não diferiu da presente no queijo controle, demonstrando que a ação antimicrobiana da proteína também não foi verificada no alimento. Mais estudos devem ser realizados, avaliando-se estas ações da lactoferrina em alimentos, uma vez que eles apresentam mais variáveis que podem afetar a ação desta proteína, comparando-se com os testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** leite, compostos bioativos, antimicrobianos natural, probiótico.

## ABSTRACT

This work evaluated the action of lactoferrin on the multiplication of *Lactobacillus casei* *in vitro* and in fresh cheese. Growth curves of *L. casei* in BHI broth containing 1 mg/mL and 2 mg/mL of lactoferrin were performed. Additionally, Minas frescal cheeses added of *L. casei* and lactoferrin (2 mg/g and 4 mg/g) and only with *L. casei* (control) were produced and stored at 4 °C during 28 days. Cheeses were analyzed for pH, titratable acidity and enumeration of *L. casei* and psychotropic microorganisms in days 1, 7, 14, 21 and 28 and for the centesimal composition in day 1. The experiment was repeated three times, and data were analyzed by ANOVA and Tukey test, with an overall risk level of 5%. When tested *in vitro*, *L. casei* multiplication was stimulated by lactoferrin, at a concentration of 2 mg/mL, but this action has not been verified in the cheese, even when added 4 mg/g of lactoferrin. Psychotropic population observed in cheeses containing lactoferrin did not differ from the present in the control one, demonstrating that the antimicrobial action of this protein has not been verified also in the food. More studies should be performed, evaluating these effects of lactoferrin in foods, since they have more variables that can affect the action of this protein, comparing to *in vitro* tests.

**Key-words:** milk, bioactives compounds, natural antimicrobial, probiotic.

## INTRODUÇÃO

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína ligadora de ferro, da família da transferrina, encontrada principalmente no leite dos mamíferos (LEVAY; VILJOEN, 1995). Esta proteína, com aproximadamente 80 kDa, é formada por dois lobos homólogos, interligados por uma alfa-hélice, e que possuem sítios de ligação de ferro (JENSSEN; HANCOCK, 2009).

A lactoferrina apresenta numerosas funções biológicas, normalmente associadas à defesa do organismo (SHIMAZAKI, 2000), tais como efeitos imunomodulatórios, antitumorais, antioxidantes e antimicrobianos (WARD; URIBE-LUNA; CONNEELY, 2002; JENSSEN; HANCOCK, 2009).

A atividade antimicrobiana foi a primeira função da Lf a ser descoberta (REITER; ORAM, 1967; ARNOLD; COLE; MCEGHEE, 1977; REITER, 1978). Durante muito tempo, acreditou-se que o único mecanismo de ação antimicrobiana da lactoferrina era a inibição da proliferação de bactérias em virtude de sua habilidade de sequestrar ferro, nutriente essencial para os microrganismos (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001; SGARBIERI, 2004).

Porém, pesquisas demonstraram que, na superfície da Lf, existem certas regiões altamente catiônicas, que exercem um efeito bactericida potente, através da interação com elementos da membrana bacteriana carregados negativamente, como os lipopolissacarídeos, nas bactérias Gram negativas, e provavelmente, os ácidos teicóico e lipoteicóico, nas Gram positivas (APPELMELK et al., 1994; GONZALEZ-CHAVEZ; AREVALO-GALLEGOS; RASCON-CRUZ, 2009).

Entretanto, a Lf não só inibe a multiplicação dos microrganismos patogênicos e deteriorantes, mas também age estimulando o aumento da população de outros, como algumas bactérias lácticas (MITSUOKA, 1990). De acordo com Coppa et al. (2006), a lactoferrina presente no leite materno mantém a predominância de bactérias que necessitam de baixas concentrações de ferro, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino da

criança. Apesar do mecanismo de ação da Lf, nesse caso, não estar ainda elucidado (COPPA et al., 2006), sugere-se que essa atividade estimulatória da Lf esteja relacionada com a presença de proteínas ligadoras de lactoferrina na superfície da membrana bacteriana (KIM et al., 2004).

Desse modo, a Lf pode ser uma alternativa para a aquisição de ferro pela bactéria, se esta última apresentar receptores de membrana externos capazes de se ligar especificamente com o complexo Lf-ferro, o que resulta na internalização do metal (MODUN; MORRISSEY; WILLIAMS, 2000; KIM et al., 2004). De acordo com Bezkorovainy e Topouzian (1981), o requerimento de ferro pela bactéria é cepa-dependente e a promoção da multiplicação provocada pela lactoferrina é heterogênea entre as diferentes cepas.

Na última década, produtos lácteos contendo Lf bovina e microrganismos probióticos têm sido desenvolvidos (KENJIN, 2002; RAHMAN et al., 2010). A adição da Lf como um promotor da multiplicação de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* em um produto lácteo é uma opção interessante para os consumidores, que poderiam contar com os benefícios proporcionados pela Lf, e também pelo microrganismo probiótico. Com o exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se ocorre promoção da multiplicação de *Lactobacillus casei* pela lactoferrina, em meio de cultura e no Minas frescal, um queijo macio, não adicionado de conservantes, com baixa concentração de sal e, conseqüentemente, de vida-de-prateleira curta. Além disso, a ação antimicrobiana da lactoferrina sobre os microrganismos deteriorantes do queijo também foi avaliada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *1. Preparo do inóculo*

Para o teste *in vitro*, a cepa de *Lactobacillus casei* (Danisco, Dangé, França) foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Mumbai, Índia) e incubada em estufa (Tecnal, Piracicaba, Brazil) a 37 °C por 48 horas, em condições aeróbicas. Em seguida, este caldo inoculado foi semeado

em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, Himedia) e as placas, incubadas nas mesmas condições anteriores.

A cultura de *L. casei* adicionada em cada queijo foi reativada em leite, no dia anterior à produção dos mesmos. Para isso, leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brasil) foi reconstituído em água a 80 °C (1:10), resfriado a 37 °C e adicionado da cultura liofilizada. A mistura foi incubada em estufa a 37 °C por 3 horas. Em seguida, foram armazenadas sob refrigeração (5 °C), durante 18 horas.

## 2. Curva de crescimento de *L. casei* em meio de cultura

Foram preparados três tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI em cada um: 1) caldo controle; 2) adição de Lf (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 1 mg/mL; 3) adição de Lf, na concentração de 2 mg/mL. Em cada um desses tubos foram adicionadas, aproximadamente, cinco colônias pequenas (< 1mm) de *L. casei*, retiradas das placas de MRS preparadas previamente.

Após homogeneização, uma alíquota de cada tubo foi coletada e a absorbância, lida em espectrofotômetro (Biomat 3, Thermo Scientific, San Jose, EUA) a 660 nm. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C, durante 48 horas, tendo a absorbância lida a cada 120 minutos. Todo o experimento foi repetido cinco vezes.

A enumeração de *Lactobacillus casei* foi realizada, nos três tubos, no início (0 h) e no final da curva (32 h), homogeneizando-se 0,1 mL do caldo com 0,9 mL de solução salina 0,85% (Synth, Diadema, Brazil) esterilizada. A partir desta diluição inicial, foi preparada uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL das diluições foram semeadas, em profundidade, em ágar MRS. Após 48 horas a 37 °C, em aerobiose, as colônias foram contadas e os resultados, expressos em UFC/g (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005).

### 3. *Produção do queijo Minas frescal*

Leite pasteurizado integral não homogeneizado (Mamele, Araçongas, Brasil) teve seu teor de gordura padronizado para 3%, com a adição de leite pasteurizado desnatado (Frimesa, Marechal Cândido Rondon, Brasil). A mistura passou por um processo de pasteurização lenta (65 °C/30 minutos) e foi, posteriormente, resfriada até 37 °C em banho de gelo, quando foi adicionada a cultura de *L. casei*, preparada no dia anterior. Após meia hora de incubação a 37 °C, foram adicionados cloreto de cálcio 50% (0,25 mL/L, Synth, Diadema, Brazil), ácido láctico 85% (0,25 mL/L, Cinética Reagentes & Soluções, Jandira, Brasil) e coalho em pó (Bela Vista, Alto da Bela Vista, Brazil), diluído em água destilada - 1:10 - e em proporção suficiente para coagular o leite em 30 minutos, calculada de acordo com Wolfschoon-Pombo, 1980). Após 30 minutos, o ponto de corte foi verificado e a massa, cortada. A massa permaneceu em repouso durante cinco minutos e, em seguida, foi agitada levemente com auxílio de uma espátula durante três minutos. Aproximadamente um terço do total de soro foi retirado, e adicionou-se, ao remanescente, cloreto de sódio (15 g/L, Cisne, Cabo Frio, Brasil) seguido por repouso de dois minutos. Em seguida, realizou-se outra dessoragem parcial, retirando-se aproximadamente mais um terço do total inicial de soro. A massa, com o soro remanescente, foi pesada e dividida em três partes iguais, sendo que a lactoferrina foi adicionada em duas delas, nas proporções de 2 mg/g de massa (Lf2) e 4 mg/g de massa (Lf4), e a terceira parte foi utilizada como controle. Os queijos foram enformados e mantidos sob refrigeração, sendo virados a cada 15 minutos, totalizando três viragens. Em seguida, foram armazenados por 12 horas a 5 °C, antes de serem retirados das formas, fracionados e embalados a vácuo. Os produtos embalados foram estocados sob refrigeração (5 °C) durante 28 dias, até a realização das análises. Todo o experimento foi repetido três vezes.

### 4. *Análises físico-químicas*

O leite utilizado em cada produção dos queijos teve seu teor de gordura, pH e acidez titulável avaliados. Os queijos foram analisados quanto à sua composição centesimal (teores de proteína, lipídeos, cinzas, carboidratos,



cloretos e sólidos totais) no dia 1 e quanto ao pH e acidez titulável, nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

As análises foram realizadas seguindo os procedimentos da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2003). O pH dos leites e queijos foram mensurados utilizando-se potenciômetro de imersão (Tecnal, Piracicaba, Brasil) previamente calibrado. A acidez foi determinada através de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (Cinética Reagentes & Soluções, Jandira, Brasil) utilizando fenolftaleína como indicador. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl e o de proteína total, multiplicando-se o teor de nitrogênio total por 6,38. O teor de cinzas foi avaliado pelo método gravimétrico de incineração em mufla (FDG Equipamento, EDGCON 1P, São Paulo, Brasil) a 550 °C e o de sólidos totais, por secagem em estufa de circulação forçada (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) à temperatura de 105 °C, por 16 h. O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, e o de cloretos, pelo método de Volhard. O teor de lactose foi calculado subtraindo-se, do teor de sólidos totais, os teores de lipídeos, proteínas e cinzas.

##### *5. Análises microbiológicas do queijo Minas frescal*

A enumeração de *Lactobacillus casei* foi realizada após um, sete, 14 e 21 dias da produção dos queijos. Para isso, 10 gramas das amostras foram homogeneizados com 90 mL de solução salina 0,85% (Synth, Diadema, Brazil) esterilizada, em bolsas plásticas apropriadas (Nasco Whirl-Pak, Fort Atkinson, EUA). A partir desta diluição inicial, foi preparada uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL das diluições foram semeadas, em profundidade, em ágar MRS. Após 48 horas a 37 °C, em aerobiose, as colônias foram contadas e os resultados, expressos em UFC/g (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005).

Para a enumeração dos microrganismos psicrotópicos, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em superfície de ágar para contagem padrão (Himedia). As placas foram incubadas a 7 °C, e após 10 dias, o número de colônias foi contado e multiplicado por 10 e pelo fator inverso de diluição da respectiva placa, sendo o resultado expresso em UFC/g

(SWANSON et al., 1992).

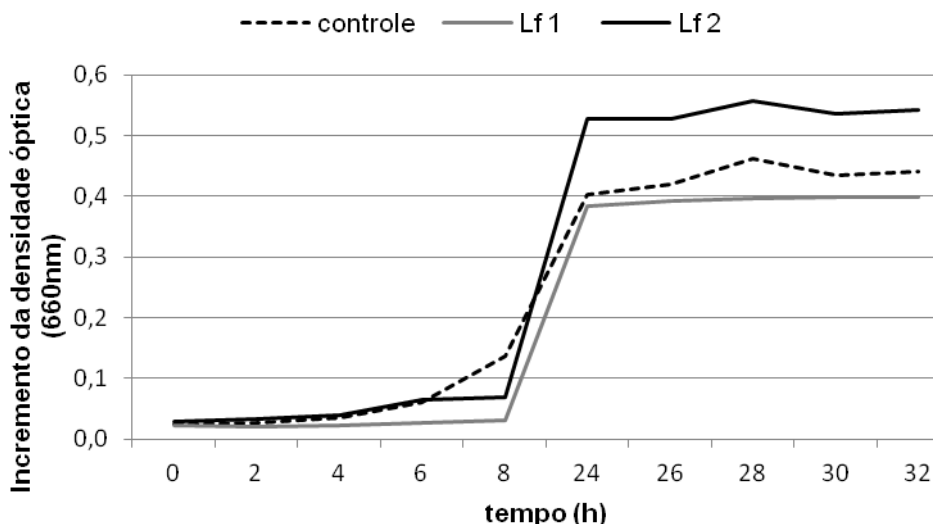
#### 6. Análise dos dados

Os resultados das análises foram avaliados através de análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Curva de crescimento de *L. casei* em meio de cultura

Observando-se os valores de densidade óptica dos caldos BHI incubados em estufa a 37 °C (Figura 1), verificou-se que houve, durante 32 horas, aumento da população de *L. casei* ( $p < 0,05$ ), tanto no caldo controle, quanto nos que continham lactoferrina (1 mg/mL e 2 mg/mL). Não foi verificada diferença entre os tratamentos controle e com adição de 1 mg/mL de Lf (Lf1) ( $p > 0,05$ ). Porém, no caldo contendo 2 mg/mL de Lf (Lf2), observou-se a promoção da multiplicação de *L. casei* ( $p < 0,05$ ), confirmada, também, pela enumeração das populações iniciais (0 h) e finais (32 h) do microrganismo probiótico nestes caldos. Os incrementos observados nas populações de *L. casei* foram de 5,32, 5,33 e 6,48 log UFC/mL nos caldos controle, Lf1 e Lf2, respectivamente, após as 32 horas em estufa a 37 °C.



**Figura 1.** Incremento da densidade óptica (660 nm), em caldo BHI (controle) e caldo BHI adicionado de 1 mg/mL de lactoferrina (Lf1) e de 2 mg/mL de lactoferrina (Lf2), durante 32 h a 37 °C, em decorrência do aumento da população de *L. casei*.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a ação estimulatória da Lf sobre *L. casei* parece ser dose dependente, uma vez que este microrganismo probiótico foi estimulado somente no caldo contendo a maior concentração testada da proteína em sua forma nativa (2 mg/mL) (Figura 1). Resultados diferentes foram observados por Kim et al. (2004), que avaliaram a influência da apo (livre de ferro) e da holo (saturada de ferro) lactoferrina bovina, além da forma nativa desta proteína, na multiplicação de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* e *B. bifidum*. Estes autores observaram que houve promoção da multiplicação de todas as cepas pela Lf, sendo esta ação, mais modesta sobre *Bifidobacterium*, comparando-se com *L. acidophilus*. Além disso, o grau de saturação de ferro não influenciou as espécies do gênero *Bifidobacterium*, mas sim *L. acidophilus*, que teve sua multiplicação estimulada pela holo-Lf (1 mg/mL) e pela Lf nativa (0,5 mg/mL), e não pela apo-Lf.

Por outro lado, Tian et al. (2010) testaram a ação da Lf nas concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/mL, em meio de cultura, sobre a multiplicação dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *L.*

*plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* e *Bifidobacterium lactis* e não observaram ação estimulatória ou inibitória da lactoferrina, nas doses testadas.

## 2. Características físico-químicas do queijo Minas frescal

Os queijos produzidos neste trabalho, adicionados ou não de Lf, não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação à composição centesimal. Em média, os produtos continham 65,80% de umidade, 2,67% de cinzas, 1,25% de sal, 14,25% de proteínas, 13,17% de lipídios e 4,11% de carboidratos.

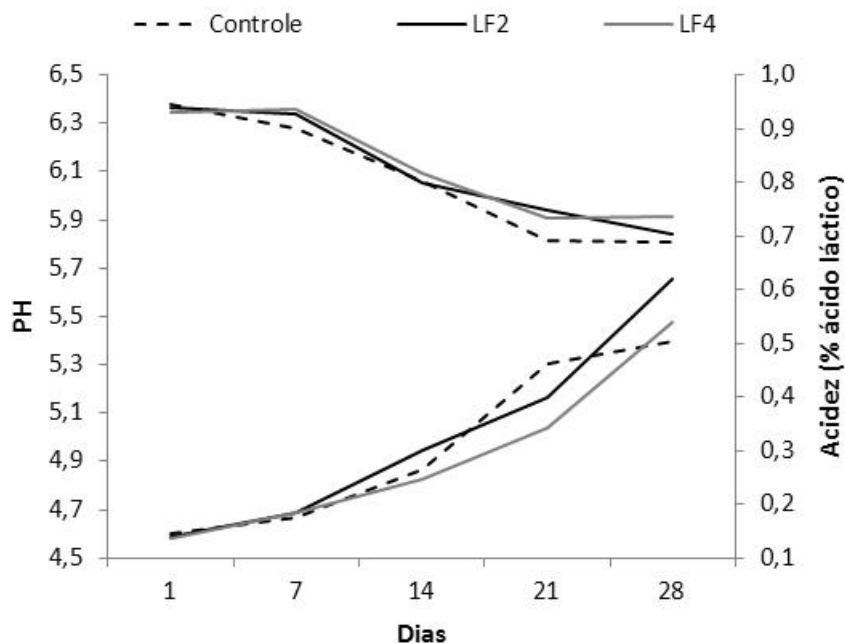
De acordo com estes resultados, os queijos produzidos atenderam aos padrões oficiais exigidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo Minas frescal (BRASIL, 2004), que determina que este queijo deve ser semi-gordo (25 a 44,9% de gordura no extrato seco) e com muito alta umidade (acima de 55%).

Apesar da grande variação existente na composição do queijo Minas frescal, os valores de proteínas e lipídeos observados neste trabalho estão dentro da faixa citada por outros autores, de 11 a 15% e de 12 a 21%, respectivamente (DORNELLAS, 1997, ALEGRO, 2003; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005). Em relação ao sal, o teor observado neste trabalho foi menor que os verificados por outros autores (1,4 a 1,6%) (DORNELLAS, 1997; CAMPOS, 2000).

Além disso, durante os 28 dias de armazenamento refrigerado dos queijos, verificou-se queda dos valores de pH e aumento da acidez dos produtos ( $p < 0,05$ ) (figura 2). Esse comportamento ocorreu devido à multiplicação dos microrganismos probióticos e psicrotóxicos nos queijos, que degradaram a lactose presente, com consequente produção de ácido.

O incremento nos valores da acidez e a diminuição do pH, durante o tempo de armazenamento, foram de 0,57 e 0,369; 0,53 e 0,48; 0,44 e 0,404 para os queijos controle, LF2 e LF4, respectivamente (figura 2). Não

houve diferença entre os três tratamentos (controle, LF2 e LF4) em relação a estes parâmetros ( $p > 0,05$ ).

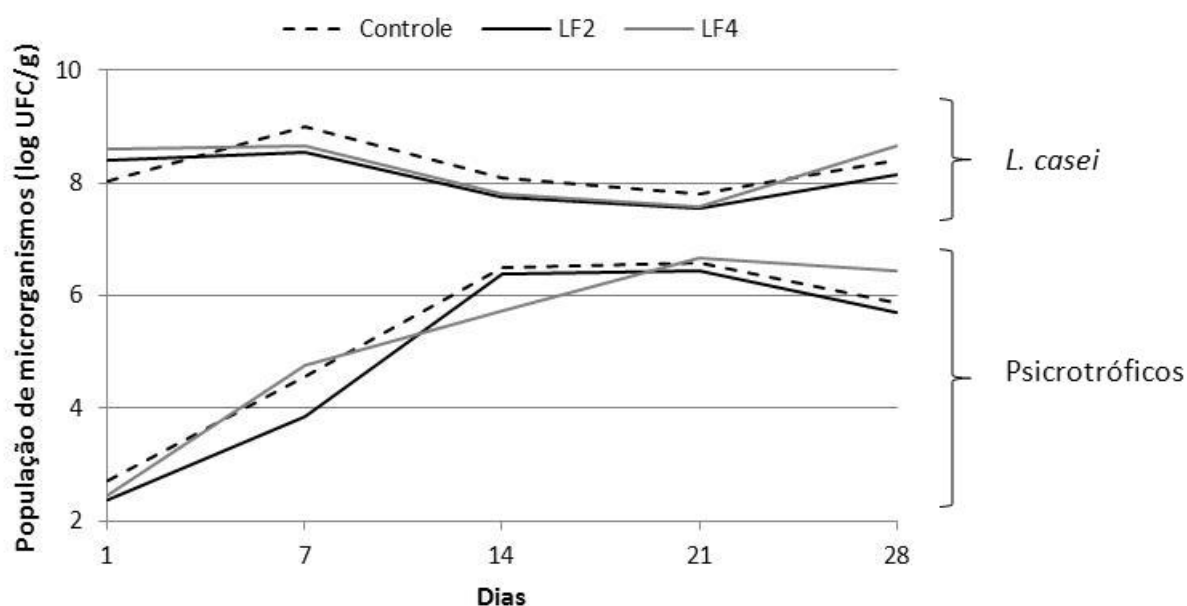


**Figura 2.** Valores médios de pH e acidez dos queijos probióticos controle, Lf2 (2 mg/g de lactoferrina) e Lf4 (4 mg/g de lactoferrina) durante 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C).

Os valores de pH dos queijos produzidos neste trabalho variaram de 6,38 a 5,81, durante os 28 dias de armazenamento. Apesar de a maioria das bactérias se multiplicarem melhor em pH próximo ao neutro, valores mais baixos de pH são tolerados por *Lactobacillus*. Buriti et al. (2005) verificaram incremento na população de *L. paracasei* em queijo Minas frescal acidificado com ácido láctico e armazenado durante 21 dias a 5 °C, com valores de pH variando entre 6,57 e 5,99.

Nos três queijos probióticos elaborados, a população média de *Lactobacillus casei*, durante o armazenamento sob refrigeração (4 °C), variou entre 7,54 (Lf2) e 8,99 (controle) log UFC/g (figura 3), não tendo sido verificada diferença ao longo do tempo ou entre os tratamentos. Estes resultados evidenciam que não houve influência positiva ou negativa, da lactoferrina na

multiplicação de *L. casei* ( $p>0,05$ ) durante os 28 dias, nas concentrações testadas.



**Figura 3.** Populações médias de *Lactobacillus casei* e de microrganismos psicotróficos nos queijos probióticos controle, LF2 (2 mg/g de lactoferrina) e LF4 (4 mg/g de lactoferrina), durante 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C).

Apesar de não ter sido verificada promoção da multiplicação do probiótico, a população de *L. casei* manteve-se acima da concentração mínima viável sugerida por alguns autores, durante a vida-de-prateleira, para que se possa observar efeitos positivos sobre a saúde do consumidor, cujos valores variam entre  $10^6$  UFC/g ou mL (SHAH et al., 1995) e  $10^7$  UFC/g ou mL de produto (RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000).

Vários autores avaliaram a promoção da multiplicação de microrganismos probióticos pela Lf em meio de cultura (GRIFFITHS et al., 2003; KIM et al., 2004; RAHMAN et al., 2010; TIAN et al., 2010). Trabalhos avaliando-se a ação da lactoferrina em queijos já foram realizados, objetivando-se avaliar a atividade antimicrobiana desta proteína (KENJIN, 2002; QUINTIERI et al., 2012), mas não a sua capacidade de promover a multiplicação dos probióticos.

Por ser um produto não maturado, de massa macia e crua, muito úmido, com baixo teor de sal e pouco ácido, o queijo Minas frescal permite o desenvolvimento de muitos microrganismos, como os deteriorantes, que utilizam os nutrientes do alimento, produzindo ácido láctico e outros subprodutos, ou ainda, bactérias patogênicas, como *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, que podem causar infecções ou intoxicações de origem alimentar (FOX et al., 2000).

Assim, um dos principais fatores que limitam o período de validade do queijo Minas frescal é o desenvolvimento microbiano (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001). A temperatura de armazenamento desse tipo de queijo (4 °C) inibe, de maneira geral, a multiplicação dos microrganismos, com exceção dos psicotróficos, que têm a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento (COUSIN, 1982).

Os psicotróficos são um grupo de microrganismos importantes em alimentos refrigerados por períodos de uma a quatro semanas (PERRY, 2004), que podem causar deterioração do produto. As principais bactérias psicotróficas que deterioram produtos lácteos pertencem ao gênero *Pseudomonas* (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005), que, em sua maioria, produzem proteases e/ou lipases extracelulares em temperaturas de refrigeração (ARCURI et al., 2008; TEBALDI et al., 2008). Estas enzimas são responsáveis pela proteólise, lipólise, alterações no sabor e aroma e pigmentação dos queijos (PERRY, 2004; CANTONI; BERSANI, 2010).

Verifica-se, na figura 3, que a população de psicotróficos presente nos queijos aumentou aproximadamente quatro ciclos logarítmicos de durante os 28 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ), com valores médios iniciais e finais de 2,5 e 6,6 log UFC/g, respectivamente. Este resultado indica que a lactoferrina não foi eficiente no controle da microbiota deteriorante presente nos queijos Minas frescal.

Quintieri et al. (2012) avaliaram a ação da lactoferrina bovina hidrolisada pela pepsina (LFH) sobre a microbiota natural presente em três queijos mussarela comerciais (A, B e C), armazenados a 4 °C durante sete

dias. Os autores observaram que a atividade inibitória da LFH depende principalmente da população bacteriana estudada, mas também da amostra analisada. Na amostra A, não houve diferença entre nas populações de mesófilos e *Pseudomonas* presentes nos queijos controle e adicionados de LFH nas concentrações de 0,4 mg/mL e 2 mg/mL. Porém, verificou-se sua ação antimicrobiana em relação aos coliformes, sendo que a maior concentração testada apresentou efeito em menor período de tempo. Na amostra B, pelo menos em algum período, todos os microrganismos foram inibidos pela LFH. Somente os coliformes não foram inibidos na amostra C.

A atividade antimicrobiana da Lf em queijo cottage contaminado artificialmente com *Escherichia coli* foi avaliada por Kenjin (2002). O autor comparou as populações de *E. coli* em três queijos: controle, adicionado de Lf nativa e adicionado de Lf glicosilada e verificou aumento das populações em todos os queijos, que ficaram armazenados a 15 °C, durante nove dias. A partir do sexto dia, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os incrementos na população de *E. coli* nos queijos, durante o período de armazenamento foram de aproximadamente 1,5, 2 e 1 ciclos logarítmicos, nos queijos controle, com Lf nativa e com Lf glicosilada, respectivamente. Os resultados mostraram que a molécula da Lf nativa não foi eficiente no controle da *E. coli* no queijo.

Neste trabalho, a adição de 2 mg/mL de lactoferrina foi capaz de estimular a multiplicação de *L. casei* em meio de cultura, mas não no queijo Minas frescal, mesmo quando adicionado o dobro da concentração eficaz no caldo BHI. Uma hipótese para este comportamento é a presença, no queijo, de microrganismos psicrótrópicos produtores de enzimas com atividade proteolítica, que podem ter degradado a lactoferrina adicionada (MOUSHUMI; SOMKUTI, 2010). Em relação aos psicrótrópicos, o efeito bactericida da lactoferrina pode ter sido afetado pelo pH, pela presença de cátions e/ou pelo tamanho da população destes microrganismos (DEL OLMO; MORALES; NUÑEZ, 2008).



## **CONCLUSÃO**

Nos testes *in vitro*, a lactoferrina, na concentração de 2 mg/mL, estimulou a multiplicação de *L. casei*, mas o mesmo comportamento não foi observado no queijo Minas frescal, mesmo quando se utilizou 4 mg/mL. Mais estudos em alimentos são necessários, uma vez que, comparando-se com os testes realizados em meio de cultura, os alimentos apresentam mais variáveis que podem afetar a ação da Lf.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP), pelo auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica do aluno Edson Renato Honjoya.

## REFERÊNCIAS

ALEGRO, J. H. A. Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura. Dissertation (Master of Biochemical-Pharmaceutical Technology) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2003.

ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; GROENINK, J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 345-52, 2001.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists **Official Methods of Analysis**, 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

APPELMELK, B.J.; AN, Y. Q.; GEERTS, M.; THIJS, B. G.; DE BOER, H. A.; MACLAREN, D. M.; DE GRAAFF, J.; NUIJENS, J. H. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2628–2632, 1994.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MCEGHEE, JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v. 197, p. 267-265, 1977.

BEZKOROVAINY, A.; TOPOUZIAN, N. The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *Bifidobacterium bifidus* var. *pennsylvanicus*. **Clinical Biochemistry**, v. 14, p. 135–41, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijos**. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Brasília, 2004.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 38, p. 173-180, 2005.

BURITI, F. C. A., ROCHA, J. S., SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, p.1279-1288, 2005.

CAMPOS, A. C. Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal. Dissertation (Master of Food Technology) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2000.

CANTONI, C.; BERSANI C. Mozzarella blu cause ed ipotesi. **Industrie alimentari**, v. 49, p. 27-30, 2010.

COPPA, G. V.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; GABRIELLI, O. Prebiotics in human milk: a review. **Digestive Liver Disease**, v. 38, Suppl. 2, p. 291–294, 2006.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

DEL OLMO, A.; MORALES, P.; NUÑEZ, M.; Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: influence of environmental and physiological factors. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 2468-2474. 2008.

DORNELLAS, J. R. F. Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise, e “shelf life” do queijo Minas Frescal. Dissertation (Master of Food Technology) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1997.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: AN Aspen Publication, p. 587, 2000.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: Marshall, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, chap. 8, p. 271-286, 2005.

GONZALEZ-CHAVEZ, S. A.; AREVALO-GALLEGOS, S.; RASCON-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 301–308, 2009.

GRIFFITHS, E. A., L.; DUFFY, L.; SCHANBACHER, D.; DRYJA, A.; LEAVENS, R.; NEISWANDER, H.; QIAO, D.; DIRIENZO; P. OGRA. In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. **Digestive Disease Science**, v. 48, p. 1324–1332, 2003.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v.91, n.1, p.19-29, 2009.

KENJIN, N. Potent antimicrobial effects of the glycosylated lactoferrin. **Food Preservation Science**, v. 28, n. 5, p. 243-246, 2002.

KIM, W. S.; OHASHI, M.; TANAKA, T.; KUMURA, H.; KIM, G. Y.; KWON, I. K.; GOH, J. S.; SHIMAZAKI, K. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Biomaterials**, v. 17, p. 279–283, 2004.

LEVAY, P. F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Haematologica**, v.80, p.252–267, 1995.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.

MITSUOUKA, T. *Bifidobacteria* and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-267, 1990.

MODUN, B.; MORRISSEY, J.; WILLIAMS, P. The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 231–237, 2000.

MOUSHUMI, P.; SOMKUTI, G. A. Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 173-178, 2010.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

QUINTIERI, L.; CAPUTO, L.; MONACI, L.; DESERIO, D.; MOREA, M.; BARUZZI, F. Antimicrobial efficacy of pepsin-digested bovine lactoferrin on spoilage bacteria contaminating traditional Mozzarella cheese. **Food Microbiology**, v. 31, p. 64-71, 2012.

RAHMAN, M.M.; KIM, W. S.; KUMURA, H.; SHIMAZAKI, K. Screening of *Bifidobacterium* spp. based on in vitro growth responses to bovine lactoferrin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 453–458, 2010.

REITER, B. Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 131-147, 1978.

REITER, B.; ORAM, J. D. Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. **Nature**, v. 216, p. 328-330, 1967.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v. 49, n. 10, p. 471-75, 1997.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZ, M. L.; KYLE, W. S. A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 515-21, 1995.

SHIMAZAKI, K. Lactoferrin: A marvelous protein in milk. **Animal Science Journal**, v. 71, p. 329–347, 2000.

STATSOFT, Inc., 2000. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.

SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHANSON M. G. Colony count methods. In **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 3rd edn., Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. (eds). American Public Health Association: Washington, p. 239-249, 1992.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leites cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.

TIAN, H.; MADDOX, I. S.; FERGUSON, L. R.; SHU, Q. Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. **Biometals**, v. 23, p. 593–596, 2010.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-75, 2000.

WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELEY; O. M. Lactoferrin and host defense. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, p. 95-102, 2002.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Sobre a determinação da força do coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 207-212, p. 33-34, 1980.

#### 4 CONCLUSÃO

Nos testes *in vitro*, a lactoferrina, na concentração de 2 mg/mL, estimulou a multiplicação de *L. casei*, mas o mesmo comportamento não foi observado no queijo Minas frescal, mesmo quando se utilizou 4 mg/mL. Mais estudos em alimentos são necessários, uma vez que, comparando-se com os testes realizados em meio de cultura, os alimentos apresentam mais variáveis que podem afetar a ação da Lf.

## 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. E.; TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 311–316, 2008.

ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; GROENINK, J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 345-52, 2001.

ALVAREZ-OLMOS, M. I.; OBERHELMAN, R. A. Probiotic agentes and diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infection Disease**, v. 32, p. 1567-76, 2001.

ANDERSON, B. F.; BAKER, H. M.; DODSON, E. J.; NORRIS, G. E.; RUMBALL, S. V.; WATERS, J. M.; BAKER, E. N. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 84, p. 1769-1773, 1987.

ANNANE D.; BELLISSANT E.; CAVAILLON J. M. Septic shock. **Lancet**, v. 365, p. 63–78, 2005.

APPELMELK, B. J.; AN Y. Q.; GEERTS, M.; THIJS, B. G.; DE BOER, H. A.; MACLAREN, D. M.; DE GRAAFF, J.; NUIJENS, J. H. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. **Infection Immunity**, v. 62, p. 2628– 2632, 1994.

APPELMELK, B. J.; AN Y. Q.; GEERTS M.; THIJS B. G.; DE BOER H. A.; MACLAREN D. M.; DE GRAAFF J.; NUIJENS J. H. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2628–2632, 1994.

ARNOLD, R. R.; RUSSELL, J. E.; CAMPEÃO, W. J.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. a atividade bactericida da lactoferrina humana: a diferenciação da estase de privação de ferro. **Infection Immunity**, v. 35, p. 792-799, 1982.

ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MCEGHEE JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v. 197, p. 267-265, 1977.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

BAGGIOLINI, M.; DE DUVE, C.; MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 131, p. 559–570, 1970.

BAKER, E. N.; ANDERSON, B. F.; BAKER, H. M.; DAY, C. L.; HARIDAS, M.; NORRIS, G. E.; RUMBALL, S. V.; SMITH, C. A.; THOMAS, D. H. Three-

dimensional structure of lactoferrin in various functional states. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 357, 1±, 1994.

BAKER, H. M.; BAKER, E. N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*, v. 17, p. 209–216, 2004.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, v. 91, n. 1, p. 3-10, 2009.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 2531-2539, 2005.

BAUMAN, D.E.; LOCK, A. L. Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance. In: P. F. Fox and P. L. H. McSweeney (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry*, v. 2: Lipids, 3rd Edition. p. 93-136. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2006.

BAVEYE, S.; ELASS, E.; FERNIG, D. G.; BLANQUART, C.; MAZURIER, J.; LEGRAND D. **Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules**, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14- lipopolysaccharide complex. *Infect Immun*, v. 68, p. 6519–6525, 2000a.

BAVEYE, S.; ELASS, E.; MAZURIER, J.; LEGRAND, D. Lactoferrin inhibits the binding of lipopolysaccharides to L-selectin and subsequent production of reactive oxygen species by neutrophils. *FEBS Lett*, v. 469, p. 5–8, 2000b.

BAVEYE, S.; ELASS, E.; MAZURIER, J.; SPIK, G.; LEGRAND, D. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 37, p. 281–286, 1999.

BELLAMY, W.; TAKASE, M.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE, K.; TOMITA, M. espectro antibacteriano de lactoferrin B, um potente péptido bacteriana derivada da região N-terminal da lactoferrina bovina. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 73, p. 472-479, 1992.

BELLAMY, W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K. et. al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1121, n. (1–2, p. 130–136, 1992.

BERLINER, N.; HSING, A.; GRAUBERT, T.; SIGURDSSON, F.; ZAIN, M.; BRUNO, E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor induction of normal human bone marrow progenitors results in neutrophil-specific gene expression. *Blood*, v. 85, p. 799–803, 1995.



BEZAULT, J.; BHIMANI, R.; WIPROVNICK, J. et al. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. **Cancer Research**, v. 54, p. 2310– 2312, 1994.

BIELECKA, N.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for simbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 2-3, p. 125-131 2002.

BOLSCHER, J. G. Efeito bactericida de lactoferrina e lactoferrina quimera contra *Vibrio parahaemolyticus* halofílicas. **Biochimie**, v. 91, p. 133-140, 2009.

BONAPARTE, C.; REUTER G. Bifidobacteria in commercial dairy products: which species are used. **Microecol Ther**, v. 26, p. 181–98, 1997;

BRASIL – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Portaria Nº 352, de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, 08/09/1997, seção 1, página 19684, 1997.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 11/03/1996, seção 1, página 3977, 1996.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Altera a Portaria nº 352 de 04/09/1997. **Diário Oficial da União**, 05/03/2004, seção 1, página 5, 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista das alegações aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 20 set. 2010.

BRITIGAN, B. E.; LEWIS, T. S.; WALDSCHMIDT, M.; MCCORMICK, M. L.; KRIEG, A. M. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. **Journal Immunol**, v. 167, p. 2921–2928, 2001.

BRODIE, A .H.; AINSCOUGH, E .W.; BAKER, E. N.; BAKER, H. M.; SHONGWE, M. S.; SMITH C. A. Synergism and substitution in the lactoferrins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 357, p. 33-44, 1994.

BROXMEYER, H. E.; DE SOUSA, M.; SMITHYMAN, A.; RALPH, P.; HAMILTON, J.; KURLAND, J. I.; BOGNACKI, J. Specificity and modulation of

the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. **Blood**, v. 55, p. 324-333, 1980.

BULLEN, J. J. The significance of iron in infection. **Review Infectious Disease**, v. 3, p. 1127–1138, 1981.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; LEIGH, L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infections in infants. **British Medical Journal**, v. 1, p. 69–75, 1972.

BURITI et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LEBENS-M-WISS.u.-Technol**, v. 38, p. 173–180, 2005.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 38, p. 173-180, 2005.

CARDARELLI, H. R. **Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico**. São Paulo: Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, USP, 2006.

CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo *petitsuisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 386-393, 2006.

CHATERIS, W. P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**. Long Hanborough, v. 51, n. 3, p. 123-136, 1998.

CHOI, B. K.; ACTOR, J. K.; RIOS, S. et al. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*: effect of terminal N-acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. **Glycoconj Journal**, v. 25, n. 6, p. 581–593, 2008.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

DE VOS, P.; TRÜPER, H. G.; TINDALL, B. J. Judicial commission of the International committee on Systematics of Prokaryotes, Xth International (IUMS) Congress of bacteriology and applied Microbiology, minutes of the meeting, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, 2005. v. 55, n. 1, p. 525-532, 2002,

2005.

DESAI, A. R.; SHAH, N. P.; POWELL, I. B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **Jounal Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3345-3351, 2006.

LEGRAND, D.; MAZURIER, J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. **Biometals**, v.23, n.3, p.365-76, 2010.

ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J.; LAFORCE, F. M. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2774-2781, 1988.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Estatísticas do Leite**. 2007. Disponível em <<http://www.cnpgl.embrapa.br/>>. Acesso em 15 set. 2009.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2005

FABER, R. H.; ANDERSON, B. F.; BAKER, H. M.; BLAND, T.; DAY, C. L.; NICHOLSON, H.; SHEWRY, S.; TWEEDIE, J. W.; BAKER, E. N. Altered domain closure and iron binding in lactoferrin mutants. In Lactoferrin: Interactions and **Biological Functions**, p. 25±, 1997.

FAO; WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, October 2001.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 395-405, 2003.

FELIS, G. E. et al. Comparative sequence analysis of a recA gene fragment brings new evidence for a gange in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2113-2117, 2001.

FINKELSTEIN, R. A.; SCIORTINO, C. V.; MCINTOSH, M. A. Role of iron in microbe-host interactions. **Review Infectious Disease**, v. 5, p. 759–777, 1983.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**, São Paulo: Editorial Lemos, 2000.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: Proteins**. 3 ed. 3ed. New York: Kluwer Academic, v. 1, 2003.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional. 1998.

FUCHS, R. H. B.; TANAMATI, A. A. C.; SANTONIOLI, C. M.; GASPARELLO, E. A.; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na

obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. Curitiba: **Boletim CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 83-98, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GADO, I.; ERDEI, J.; LASZLO, V. G.; PASZTI, J.; CZIROK, E.; KONTRÖHR, T. et al. Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, n. 39, p. 2538–2543 1991.

GAHR, M.; SPEER, C. P.; DAMERAU, B.; SAWATZKI, G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, p. 427–433, 1991.

GAROFALO, R. P.; GOLDMAN, A. S. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. **Clinics in Perinatology**, v. 26, n. 2, p. 361-377, 1999.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. **European Journal Biochemistry**, v. 268, p. 5589–5600, 2001.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-12, 1995.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 42, n. 2, p. 164-167, 1979.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Science Technology**, v. 10, p. 139-157, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S.; et al. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, p. 77, 2001.

GUILLEN, C.; MCINNES, I. B.; VAUGHAN, D. M.; KOMMAJOSYULA, S.; VAN BERKEL, P. H.; LEUNG, B. P. et al. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin- transgenic mice. **Journal Immunology**, v. 168, p. 3950–3957, 2002.

HANEY, E. F.; LAU, F.; VOGEL, H. J. a estrutura da solução e interação modelo de membrana de lactoferrampin, um agente antimicrobiano péptido

derivado de bovino lactoferrina. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, p. 2355-2364, 2007.

HARRINGTON, J. P.; STUART, J.; JONES, A. Unfolding of iron and copper complexes of human lactoferrin and transferrin. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, p. 1001-1008, 1987.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition: a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, p. 25, 2007.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.

HAVERSEN, L.; KONDORI, N.; BALTZER, L. et al Structuremicrobicidal activity relationship of synthetic fragments derived from the antibacterial alpha-helix of human lactoferrin. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 418–425, 2010.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 3745-3795, 2001.

HENTGES, D. J.; MARSH W. W.; PETSCHOW B. W.; THAL W. R.; CARTER M.K; Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora-associated mice. **Journal Pediatric Gastroenterology Nutritional**, v. 14, n. 146–152, 1992.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal Clinical Nutritional**, v. 73, n. 2, Suppl, 365S-373S, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research Internatinal**, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HUTCHENS, T.W.; LOËNNERDAL, B. editors. New Jersey: **Humana Press**.

BROCK, J. H.; The physiology of lactoferrin, **Biochemistry Cell Biology**, v. 80, p. 1-6, 2002.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional dairy. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Lancaster: Techno. Publishing Co., Inc., p. 355-378, 1998.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 19-29, 2009.

JIM, L. Z.; MARQUARDT, R.R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine muçus. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4200-4, 2000.

KAWAKAMI, H.; HIRATSUKA, M.; DOSAKO, S. Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. **Agricultural Biology Chemistry**, v. 52, p. 903–908, 1988.

KIM W.S.; TANAKA T.; KUMURA H.; SHIMAZAKI K. **Biochemistry Cell Biology**, v. 80, n. 4, p. 91, 2002.

KIM, W. S.; OHASHI, M.; TANAKA, I.; KUMURA H.; KIM G. Y.; KWON, I. K.; SHIMAZAKI, K. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 279–283, 2004.

KIM, W. S.; TANAKA, I.; SHIMAZAKI, K. grow protmotion and cell binding of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*. **MILCHWISSENSCHAFT**, v. 59, n. 9-10, p. 491–494, 2004.

KIM, W. S.; OHASHI, M.; TAMAKA, T.; KUMURA, H.; KIM, G. Y.; KWOW, I. K.; GOH, J. S.; SHIMAZAKI, K. Growth-promoting effects of lactoferrina on *acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. Dairy Science Laboratory Graduate School of Agriculture, Hokkaido University. **BioMetals**, v. 17, p. 279-283, 2005.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**, 3ed. Westport: AVI, p. 728, 1997.

LEE, W. J.; FARMER, J. L.; HILTY, M.; KIM, Y. B. The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1421–1426, 1998.

LEE, Y. K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, p. 211, 1999.

LEGRAND, D.; VAN BERKEL, P. H.; SALMON, V.; VAN VEEN, H. A.; SLOMIANNY, M. C.; NUIJENS, J. H.; SPIK, G. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. **Biochem Journal**, v. 327, p. 841–846, 1997.

LEITCH, E. C.; WILLCOX, M. D. SYNERGIC ANTISTAPHYLOCOCCAL PROPERTIES OF LACTOFERRIN AND LYSOZYME. **Journal Medicine Microbiology**, v. 47, p. 837–842, 1998.

LEÓN-SICAIROS, N.; SOTO, K. F.; LÓPEZ, M. R.; VARGAS, G. D.; PICHARDO, O.C.; GARZA, M. Atividade Amoebicidal de leite, apo-lactoferrina, slgA e lisozima. **Clinical Medicine Research**, v. 4, p. 106-113, 2006.

LEVEUGLE, B.; MAZURIER, J.; LEGRAND, D.; MAZURIER, C.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. **European Journal Biochemistry**, v. 213, p. 1205–1211, 1993.

LÖNNERDAAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 93-110, 1995.

LONNERDAL, B. **Nutritional roles of lactoferrin**. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 12, p. 293–297, 2009.

MAKINO, Y.; NISHIMURA, S. High-performance liquid chromatographic separation of human apolactoferrin and monoferric and diferric lactoferrins. **Journal Chromatografy**, v.579, p. 346–349, 1992.

MANN, D. M.; ROMM, E.; MIGLIORINI, M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. **Journal Biological Chemistry**, v. 269, p. 23661–23667, 1994.

MARR, A. K.; JENSSEN, H.; MONIRI, M. R.; HANCOCK, R. E.; N PANTE Bovina lactoferrina e lactoferricin interferir com intracelular tráfico de *Herpes simplex virus-1*. **Biochimie**, v. 91, p. 160-164, 2009.

MARSHALL, B *Helicobacter pylori*: past, present and future. **Keio Journal Medicine**, v. 52, n. 2, p. 80–85, 2003.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review.**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MAZURIER, J.; LEGRAND, D.; H. U, W. L.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. **Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes**, v. 179, n. 2, p. 481-487, 1989.

MCFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and probiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 318, p. 999-1003, 1999.

MCINTOSH, G. H.; REGESTER, G. O.; LE LEU, R. K. et al Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 809–816, 1995.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

MILLER-CATCHPOLE, R.; KOT, E.; HALOFTIS, G.; FURMANOV, S.; BEZKOROVAINY, A. **Nutrition Research**, v. 17, n. 2, p. 205–213, 1997.

MINCHEVA-NILSSON, L.; HAMMARSTROM, S.; HAMMARSTROM, M. L. Activated human gamma delta T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 46, p. 609–618, 1997.

MITSUOUKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-267, 1990.

MOORE, S. A.; ANDERSON B. F.; GROOM C. R. et al Threedimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 a resolution. **Journal Molecular Biology**, v. 274, n. 2, p. 222–236, 1997.

NA, Y. J.; HAN, S. B.; KANG, J. S.; YOON, Y. D.; PARK, S. K.; KIM, H. M.; YANG, K. H.; JOE, C. O. Lactoferrin works as a new LPSbinding protein in inflammatory activation of macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1187–1199, 2004.

NABET, P.; LINDEN, G. **Constituants bioactifs in lait, nutrition et santé**. Paris: Tec. & Doc. p. 169-187, 2001.

NAOT, D.; GREY, A.; REID, I. R.; CORNISH, J. Lactoferrin—a novel bone growth factor. **Clinical Medicine & Research**, v.3, n. 2, p. 93–101, 2005.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31-34, 1998.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **J. Food Science**, Chicago, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002. (no prelo)

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K., ALEGRO, J. H. A., SAAD, S. M. I. Aspectos Tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PETSCHOW, B. W.; TALBOTT, R. D. Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatr Res* v. 29, p. 208–213, properties, **Molecular Immunology**, v 40, n. 2003, p. 395-405, 1991.

RAHMAN, M. M.; KIM, W. S.; KUMURA, H.; SHIMAZAKI, K. Growth promotional effects of bovine lactoferrin and its hydrolysate on bifidobacteria. *Milk Sci* 2004. 53:325–7. Promoters in human and cow milk. **Pediatric Research**, v. 29, n. 13, p. 208, 1991.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review Microbiology** v. 54, p. 881–941, 2000.

Braun V. Braun M. Active transport of iron and siderophore antibiotics. **Current Opinion Microbiology**, v. 5, p. 194–201, 2002.



REITER, B. Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 131-147, 1978.

REITER, B.; ORAM, J. D. Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. **Nature**, v. 216, p. 328-330, 1967.

REUTER, G. Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. **Bioscience Microflora**, v. 16, p. 43–51, 1997.

RICHARDSON, G. H. **Standard methods for examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, p. 412, 1985.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, A. J. O potencial da lactoferrina na prevenção do cancro de mama. **Leite I+D+T**, v. 5, p. 2-3, 2007.

ROTH, J. A., BOLIN, C. A.; BROGDEN, K. A.; MINION, F. C.; WANNEMUEHLER, M. I. et al. (eds), **American Society for Microbiology**, Washington, DC., 1995.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-9, 2003.

SCHAIBLE, U. E.; COLLINS, H. L.; PRIEM, F. AND KAUFMANN, S. H. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. **Journal Experimental Medicine**, v. 196, p. 1507–1513, 2002.

SCHANBACHER, F. L.; TALHOUK, R. S.; MURRAY, F. A. Biology and origin of bioactive peptides in milk. **Livestock Production Science**, v. 50, p. 105-123, 1997.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SHAH, N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, v. 84, Suppl. 1, p. 3-10, 2000.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Rational design of improved probiotics. **Journal of Biomedical Biotechnology**, v. 2009, p. 87-2752, 2009.

SOUZA, H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-

chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 633–640, 2009.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy**. **Int J Food Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

SUZUKI, Y. A; LÖNNERDAL, B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. **Biochemistry Cell Biology**, v. 80, p. 75–80, 2002.

TENOVOU, J. O. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**. Boca Raton: CRC Press. 1989.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-95, 2006.

TOMITA, M.; BELLAMY, W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K.; WAKABAYASHI, K.; KAVASE, K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin of bovine lactoferrin. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 4137–4142, 1991.

TRUMPLER, U.; STRAUB, P. W.; ROSENEMUND, A. Antibacterial prophylaxis with lactoferrin in neutropenic patients. **European Journal Clinical microbiology infection**, disc. 8, p. 310- 323, 1989.

TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 721-9, 2002.

USA - UNITED STATES OF AMERICA, U.S. Dairy Export Council. **Reference manual for U.S. Whey Products**. Arlington: VA USA, 1997.

VALENTI, P.; BERLUTTI, F.; CONTE, M. P.; LONGHI, C.; SEGANTI, L. Funções Lactoferrina: estado atual e perspectivas. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. 127-129, 2004.

VAN DER KRAAN, M. I.; GROENINK, J.; K NAZMI VEEMAN, C .E.; BOLSCHER, J. G.; NIEUW AMERONGER, A. V. **Lactoferrampin: a peptídeo antimicrobiano romance na N1-domínio de bovinos lactoferrina**. **Peptide**, v. 25, p. 177-183, 2004.

VAN DER KRAAN, M. I.; NAZMI, K.; VAN'T HOF, W.; AMERONGEN, A. V.; VEERMAN, C. E.; BOLSCHER, J. G. Distinct bactericida atividades de Bovino lactoferrina peptídeos LFampin, p. 268-284 e LFampin, p. 265-284: Asp-Leu-Ile faz a diferença. **Biochemistry Cell Biology**, v. 84, p. 358-362, 2006.

VAN DER KRAAN, M. I.; VAN DER FEITO, C.; NAZMI, K.; VAN'T HOF, W.; GROENINK, J.; VEERMAN, C. E.; BOLSCHER, J. G.; NIEUW AMERONGEN

EFEITOS A.V. das substituições de aminoácidos na atividade candidal de LFampin 265-284. **Peptide**, v. 26, p. 2093-2097, 2005.

VAN SNICK, J. L.; MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F. O envolvimento de lactoferrina no hyposiderhaemia de agudo inflamação. **Experimental Journal Medicine**, v. 140, p. 1068-1084, 1974.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic Applied Microbiology**, V. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

WAKABAYASHI, H.; ABI, S.; OKUTOMI, T.; TANSHO, S.; KAWASE, K.; YAMAGUCHI, H. de cooperação anti-Candida efeitos de lactoferrina ou os seus péptidos em combinação com azole agentes antifúngicos. **Microbiology Immunology**, v. 40, p. 821-825, 1996.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd Edition, Boca Raton: CRC Press, 2006.

WARD, P. P.; ZHOU, X.; AND CONNEELY, O. M. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin. **Journal Biological Chemistry**, v 271, p. 12790–12794, 1996.

WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELEY; O. M. Lactoferrin in host defense. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, p. 95-102, 2002.

WEINBERG, E. D. Acquisition of iron and other nutrients in vivo. In: **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, 2<sup>nd</sup> ed., p. 79–93.

WESSOLOWSKI, A.; BIENERT, M.; DATHE, M. Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. **Journal Peptide Research**, v. 64, p. 159–169 52, 2004.

WILSON, M. E.; BRITIGAN, B. E. a aquisição de ferro por parasitas protozoários. **Parasitol Today**, v. 14, p. 348-353, 1998.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Sobre a determinação da força do coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 207-212, p. 33-34, 1980.

WOOLDRIDGE, K. G.; WILLIAMS, P. mecanismos de captação de ferro de bactérias patogênicas. **FEMS Microbiol Review**, v. 12, p. 325-334, 1993.

YAMAUCHI, K.; TOMITA, M.; GIEHL, T. J.; ELLISON, R. T. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 719-728, 1993.

ZHANG, G. H.; MANN, D. M.; TSAI, C. M. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrinderived peptide. **Infection Immunology**, v. 67, p. 1353–1358, 1999.

ZIERE, G. J.; KRUIJT, J. K.; BIJSTERBOSCH, M. K.; VAN BERKEL, T. J. Recognition of lactoferrin and aminopeptidase M-modified lactoferrin by the liver: involvement of proteoglycans and the remnant receptor. **Biochemistry Journal**, v. 313, p. 289–295, 1996.