

ÉRIKA CARLA DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE
LEITE HUMANO EM DIFERENTES PERÍODOS DE LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837c
2012

Costa, Érika Carla da, 1986-
Caracterização microbiológica e físico-química de leite humano em diferentes períodos de lactação / Érika Carla da Costa. – Viçosa, MG, 2012.
78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-74

1. Leite humano - Microbiologia. 2. Lactação.
3. Físico-química. 4. Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 612.664

ÉRIKA CARLA DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE
LEITE HUMANO EM DIFERENTES PERÍODOS DE LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2012.

Prof^a. Raquel Maria Amaral Araújo

Prof^a. Edimar Aparecida Filomeno Fontes

Prof^a. Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)

Prof. Marcelo Bonnet Alvarenga
(Coorientador)

Prof^a. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

*A Deus,
Aos meus pais José Maria e Aparecida,
A minha irmã Elisa,
Ao Gabriel,
A todas as mães doadoras de leite,*

Pelo amor e apoio incondicionais, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a realização do presente estudo.

Agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos me guiando e me dando forças e por tudo que Ele tem me proporcionado.

Aos meus pais, José Maria e Aparecida, que mesmo distantes sempre foram presença viva nos momentos felizes e de dificuldades. Obrigada por todo amor e incentivo. Vocês são tudo na minha vida.

A minha irmã Elisa pelos ensinamentos, apoio e acima de tudo pela amizade. Sua ajuda foi extremamente importante para o meu desempenho.

Ao Gabriel, meu melhor amigo e namorado, que em todos os momentos me apoiou e me deu forças para a realização deste trabalho, e a toda sua família que não mediu esforços em me acolher sempre em sua casa com tanto carinho.

A Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, que contribuiu para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Em especial a professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira pelos ensinamentos transmitidos, incentivo e pela orientação.

Aos professores Ana Clarissa, Marcelo Bonnet, Raquel Amaral e Edimar Fontes pela disponibilidade e vontade de participar desse estudo.

Ao Célio de Souza, por me ajudar nas coletas do leite, sua ajuda foi indispensável.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos em especial ao Piu, Carlinhos, Célio, Geralda, Carla, Letícia, Vaninha, Lúcia,

Dimas, Juarez, Sr. Zé, Sr. Manuel, que estiveram sempre à disposição nos momentos em que eu precisei.

A todas as mães que contribuíram na doação do leite e não mediram esforços para me ajudar. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos amigos de Viçosa pela amizade e apoio em especial à Maurinha, Elisa, Ju, Delaine, Ramila, Élide, João Paulo, Rosângela, Gabriel, Arlan, Marcelle.

As amigas de república, Nicoli, Sabrina e Fabiana pela amizade.

A Michelle, Maria Vanessa e Tati pela ajuda.

A todos os amigos do Laboratório de Culturas Láticas: Carol, Eder, Erica, Juliana, Michelle, Mônica, Tatiane, Vanessa, Viviane, que direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

A todos os amigos que estiveram presentes nesta fase da minha vida.

BIOGRAFIA

ÉRIKA CARLA DA COSTA, filha de José Maria Veríssimo da Costa e Aparecida da Silva Costa, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, em 11 de dezembro de 1986.

Em maio de 2006, iniciou o curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em julho de 2010. Em agosto deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2012.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADG – Adipócitos depletados de gordura
AME – Aleitamento materno exclusivo
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
APHA – American Public Health Association
BAL – Bactérias do ácido lático
BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
BLH – Banco de leite humano
BLHs – Bancos de leite humano
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CJ – Complexo juncional
CM – Células mioepiteliais
°D – Graus dornic
DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos
FOS – Fruto – oligossacarídeos
FV – Fonte de variação
GL – Graus de liberdade
GOS – Galacto – oligossacarídeos
GG – Glóbulos de gordura
IgA – Imunoglobulina A secretória
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
JG – Junções do tipo gap
LCL – Laboratório de Culturas Láticas
LH – Leite humano

LM – Leite maduro
LT – Leite de transição
MB – Membrana basal
MS – Ministério da Saúde
N – Núcleo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCA – Plate Count Agar
PDA – Potato Dextrose Agar
RCM – Reinforced Clostridial Medium
RER – Retículo endoplasmático rugoso
RN – Recém-nascido
RNs – Recém-nascidos
TG – Trato gastrintestinal
UFC – Unidade formadora de colônia
UFV – Universidade Federal de Viçosa
VS – Vesículas secretoras
WHO – World Health Organization
WC – Wilkins Chalgren

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Denominações do leite humano conforme o período de lactação.
- Tabela 2. Composição química do leite humano.
- Tabela 3. Média e desvio padrão das análises físico-químicas do leite humano em diferentes períodos de lactação.
- Tabela 4. Valores de acidez ($^{\circ}\text{D}$) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no colostro humano.
- Tabela 5. Valores de acidez ($^{\circ}\text{D}$) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite de transição.
- Tabela 6. Valores de acidez ($^{\circ}\text{D}$) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (30 dias após o parto).
- Tabela 7. Valores de acidez (D°) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (60 dias após o parto).
- Tabela 8. Valores de acidez (D°) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (90 dias após o parto).

Tabela 9. Média e desvio padrão das contagens microbiológicas (Log_{10} UFC/ml) dos grupos pesquisados em diferentes períodos de lactação.

Tabela 10. Número de isolados obtidos do meio MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) em cada amostra analisada.

Tabela 11. Número de isolados obtidos do meio Rogosa (*Lactobacillus* spp) em cada amostra analisada.

Tabela 12. Atividade hemolítica dos isolados obtidos do meio Rogosa (*Lactobacillus* spp) de cada amostra de leite humano coletada.

Tabela 13. Atividade hemolítica dos isolados obtidos do meio MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) de cada amostra de leite humano coletada.

Tabela 14. Análise de Variância para acidez, pH, proteína, gordura, umidade, cinzas e cloretos.

Tabela 15. Análise de Variância para mesófilos aeróbios, anaeróbios, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, Coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp, fungos filamentosos e não filamentosos, *Lactobacillus* spp e *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama dos alvéolos mamários e das células alveolares no processo de formação e secreção de leite.
- Figura 2. Fluxograma do funcionamento de um banco de leite humano.
- Figura 3. Unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* e coliformes totais em placa Petrifilm.
- Figura 4. Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* em placa Petrifilm.
- Figura 5. Média ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) das contagens dos diferentes grupos microbianos em diferentes períodos de lactação.
- Figura 6. Frequência da população (UFC/mL) de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nas amostras de leite humano analisadas.

RESUMO

COSTA, Érika Carla, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Caracterização microbiológica e físico-química de leite humano em diferentes períodos de lactação.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Marcelo Bonnet Alvarenga.

O leite humano é de suma importância para o desenvolvimento da microbiota intestinal de um neonato. O mesmo apresenta variações em relação às suas propriedades físico-químicas e composições microbiológica e química ao longo da lactação. Diferentes estudos enfatizam a importância nutricional do leite humano ao neonato, mas pouco se sabe a respeito da composição microbiológica desse fluido, assim como a relação da microbiota presente com a saúde do recém-nascido. Alguns grupos microbianos geralmente encontrados nesse fluido biológico devem ser considerados como microrganismos naturais ou endógenos e não como contaminantes. Assim, o objetivo deste estudo foi pesquisar e quantificar os principais grupos microbianos do leite humano em diferentes períodos de lactação: colostro (secreção de 1 a 7 dias após o parto), leite de transição (8 a 21 dias após o parto) e leite maduro (a partir de 3 semanas após o parto). O leite recém-ordenhado foi coletado de dez nutrizes após 5, 15, 30, 60 e 90 dias da data do parto. Foram quantificados por meio de plaqueamento em meios específicos os grupos: *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, anaeróbios e fungos filamentosos e não filamentosos. Os isolados obtidos dos meios específicos para *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp foram caracterizados quanto à capacidade de síntese de hemolisina. Além disso, determinou-se o conteúdo

de proteína, lipídeos, umidade, cinzas, cloretos e análise de pH e acidez do leite humano nos mesmos períodos citados. O gênero *Clostridium* spp esteve presente em todas as amostras avaliadas, seguido por *Staphylococcus aureus* (96%), *Bifidobacterium* spp (94%), *Enterococcus* spp (88%), fungos filamentosos e não filamentosos (56%), coliformes (40%), *Bacteroides* spp (34%), *Escherichia coli* (34%) e *Lactobacillus* spp (24%). Observa-se que para mesófilos aeróbios, anaeróbios, *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os períodos de lactação, porém houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as mães. Para os grupos *Bifidobacterium* spp e fungos filamentosos e não filamentosos não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães. Já para o grupo coliformes observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação e as mães. Dos 60 isolados obtidos do meio específico para *Lactobacillus* spp, constatou-se atividade β -hemolítica em 8,33% e α -hemolítica em 8,33% e dos 235 isolados obtidos do meio específico para *Bifidobacterium* spp, constatou-se atividade β – hemolítica em 4,25%. Com relação às análises físico-químicas houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães para proteína, gordura e cloretos, sendo que para o conteúdo de água não observou-se essa diferença. A maioria das amostras analisadas foi aprovada com relação à acidez ($\leq 8^\circ$ D) e pH.

ABSTRACT

COSTA, Érika Carla, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Microbiological and physico-chemical characterization of human milk at different periods of lactation.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires and Marcelo Bonnet Alvarenga.

Human milk is very important for the development of gut microbiota of a newborn. It varies in relation to their physico-chemical, microbiological and chemical composition throughout lactation. Different studies emphasize the nutritional importance of milk for newborn, but little is known about the microbiological composition of this fluid, as well as the relationship between the microbiota present in the milk and the health of newborn. Some microbial groups typically found in this biological fluid should be considered as natural micro-organisms or endogenous and not as contaminants. The objective of this study was to investigate and quantify the main microbial groups of human milk at different periods of lactation: colostrum (secretion 1-7 days postpartum), transitional milk (8-21 days postpartum) and mature milk (from 3 weeks after birth). The fresh milk was collected from ten lactating women after 5, 15, 30, 60 and 90 days of postpartum. It were quantified by plating on specific media groups: *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, total coliforms, facultative aerobes and anaerobes, stricts anaerobes and fungi, filamentary and non-filamentary. The isolates obtained from specific means for *Lactobacillus* spp and *Bifidobacterium* spp were characterized considering their ability to synthesize hemolysin. Furthermore, we determined the content of protein, lipid, moisture, ash, chloride and analysis of pH and acid content of human milk in the same time intervals. The genus *Clostridium* spp were present in all samples, followed by *Staphylococcus aureus* (96%), *Bifidobacterium* spp (94%),

Enterococcus (88%), filamentous fungi and not filamentous (56%), coliforms (40%), *Bacteroides* spp (34%), *Escherichia coli* (34%) and *Lactobacillus* spp (24%). It was observed that for mesophilic aerobes, anaerobes, *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, no significant difference ($p > 0.05$) among the periods of lactation, but significant difference among mothers. For *Bifidobacterium* spp and filamentous fungi there were no significant difference ($p > 0.05$) among periods and among lactating mothers. Coliform group showed a significant difference between the periods of lactation and mothers. From 60 isolates of *Lactobacillus* spp, there were β -hemolytic (8.33%) and α -hemolytic (8.33%) activity and from 235 isolates of *Bifidobacterium* spp, there was only β - hemolytic activity (4.25%). With respect to physico-chemical analyzes showed significant difference ($p < 0.05$) among the periods of lactation and mothers and for protein, fat, chlorides, and for the water content there were no difference ($p > 0.05$). Most of the samples were approved with respect to acidity ($\leq 8^\circ \text{D}$) and pH.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A importância do leite humano.....	3
2.2. Fisiologia da lactação.....	4
2.3. Denominações do leite humano de acordo com o período de lactação.....	6
2.4. Composição química do leite humano	8
2.4.1. Água	9
2.4.2. Proteínas	10
2.4.3. Lipídeos	11
2.4.4. Carboidratos	12
2.4.5. Minerais	13
2.4.6. Vitaminas.....	14
2.4.7. Fatores bifidogênicos	14
2.5. A microbiota do leite humano.....	16
2.6. A colonização inicial do trato gastrintestinal do recém-nascido e sua relação com o aleitamento materno exclusivo	17
2.7. Bancos de leite humano	20
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivos gerais	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Seleção das doadoras voluntárias	25
4.2. Coleta das amostras de leite humano.....	26
4.3. Caracterização físico-química do leite humano	27
4.3.1. Determinação da acidez.....	27
4.3.2. Determinação do pH.....	27

4.3.3. Determinação do conteúdo de proteínas.....	27
4.3.4. Determinação do conteúdo de lipídeos	27
4.3.5. Determinação do conteúdo de água.....	27
4.3.6. Determinação do conteúdo de cinzas	28
4.3.7. Determinação do conteúdo de cloretos	28
4.4. Caracterização microbiológica do leite humano.....	28
4.4.1. Contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos.....	29
4.4.2. Contagem padrão de micro-organismos anaeróbios.....	29
4.4.3. Pesquisa de fungos filamentosos e fungos não filamentosos	29
4.4.4. Pesquisa de <i>Bacteroides</i> spp	29
4.4.5. Pesquisa de <i>Bifidobacterium</i> spp	30
4.4.6. Pesquisa de <i>Clostridium</i> spp	30
4.4.7. Pesquisa de <i>Enterococcus</i> spp	30
4.4.8. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	30
4.4.9. Pesquisa de <i>Lactobacillus</i> spp	31
4.4.10. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.5. Observação da biodiversidade microbiana	32
4.5.1. Coloração de Gram	32
4.6. Isolamento das colônias.....	33
4.7. Teste da atividade hemolítica	33
4.8. Análises estatísticas.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Físico-química do leite humano	35
5.1.1. Acidez.....	35
5.1.2. pH.....	39
5.1.3. Proteína.....	40
5.1.4. Lipídeos	40
5.1.5. Cloretos	42
5.1.6. Umidade	42
5.1.7. Cinzas	42
5.2. Microbiologia do leite humano	43
5.3. Biodiversidade microbiana – Coloração de Gram.....	53
5.4. Isolados obtidos	53
5.5. Atividade hemolítica	54

6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

O leite humano é um fluido biológico fundamental para a saúde do recém-nascido (RN) nos seis primeiros meses de vida por ser um alimento completo em termos nutricionais, fornecendo inclusive água, fatores de proteção contra infecções comuns da infância, isento de contaminação e perfeitamente adaptado ao metabolismo da criança (BRASIL, 2002).

A alteração da composição do leite humano está relacionada com a duração do período de gestação, com o volume de leite excretado, com a dieta materna, entre outros (PICCIANO, 2001). Algumas modificações ocorrem também durante os diferentes períodos de lactação e parecem corresponder à evolução das necessidades do recém-nascido (RN) ao longo do tempo (ANDERSON, 1985). Com relação aos diferentes períodos de lactação, o LH recebe três denominações: colostro (secreção de 1 a 7 dias após o parto), leite de transição (8 a 21 dias após o parto) e leite maduro (a partir de 3 semanas após o parto) (PICCIANO, 1998). Nessas fases, a concentração de macro e micronutrientes varia no leite de uma mesma nutriz (MORGANO et al., 2005), assim como a microbiota é alterada qualitativa e quantitativamente.

Diferentes pesquisas têm-se restringido apenas na identificação de bactérias contaminantes, e poucos estudos abordam o conteúdo microbiológico natural presente no LH.

Estudos comprovam que o LH é uma fonte de micro-organismos para a colonização inicial da microbiota intestinal do RN. A colonização e o desenvolvimento dessa microbiota é favorecida em lactentes em aleitamento materno exclusivo (AME) devido a promotores de crescimento presentes no leite humano, como oligossacarídeos que favorecem a multiplicação de bactérias desejáveis e devido à microbiota natural que o mesmo apresenta.

Os bancos de leite humano (BLHs) desempenham importante função de

suprir as necessidades alimentares dos recém-nascidos (RNs) prematuros ou incapacitados de receberem o leite de suas próprias mães. O leite processado nesses bancos é pasteurizado (62,5 °C por 30 minutos) a fim de garantir a segurança microbiológica deste alimento. Esse tratamento térmico elimina a microbiota do leite que contribui para o início da colonização de uma microbiota desejável no lactente.

As informações geradas com relação à microbiota do LH serão úteis na priorização de diferentes espécies que poderão ser utilizadas como adjunto por meio de sua adição ao leite pasteurizado nos bancos, carreando ao RN a composição específica do período em o mesmo se encontra. Dessa forma a reposição da microbiota perdida pelo tratamento térmico irá contribuir para a microbiota ainda em formação do RN, estimulando o amadurecimento do sistema imune do neonato protegendo-o nessa fase inicial da vida. Além disso, as estirpes isoladas e selecionadas, se apresentarem aspectos funcionais (probióticos), poderão ter outras aplicações na área pediátrica.

Nesse estudo, a caracterização microbiológica e físico-química do LH teve como finalidade determinar quantitativa e/ou qualitativamente as modificações e variações ocorridas ao longo do período de lactação auxiliando dessa forma no gerenciamento dos BLHs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância do leite humano

Nos primeiros anos de vida, uma criança necessita de alimentos com elevados níveis nutricionais para seu desenvolvimento e crescimento. Dessa forma, o aleitamento materno exclusivo (AME) é de extrema importância para que a criança possa crescer saudável (SILVA e SOUZA, 2005).

Segundo a definição da Organização Mundial da Saúde, um lactente é amamentado de forma exclusiva (AME) quando recebe somente LH (de sua mãe ou ordenhado) e não recebe qualquer outros líquidos ou alimentos sólidos, à exceção de gotas de vitaminas, minerais ou outros medicamentos (OMS, 2008).

A prática do AME foi documentada como evidência científica em meados da década de 80, e desde então as propriedades imunológicas e nutricionais do LH vêm sendo estudadas e confirmadas (SILVEIRA, 2009).

Devido à superioridade do LH com relação aos outros tipos de leite, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde (MS) recomendam que o RN seja alimentado exclusivamente com LH durante os primeiros seis meses de vida. A partir desse período o LH deve ser consumido de forma complementar a outros alimentos até os dois anos de idade ou mais (WHO, 2000).

A superioridade do LH quando comparado a outros alimentos deve-se a sua combinação única de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas e células vivas. Contém ainda fatores protetores e diversas substâncias bioativas importantes para o desenvolvimento da criança (GERMAN et al., 2002; LONNERDAL, 2000). É particularmente rico em

imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos, fatores tróficos, substâncias imunomoduladoras e anti-inflamatórias (EUCLYDES, 2005).

A presença de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE), linfócitos, macrófagos, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, ácidos graxos, proteinase e fatores bifidos no LH conferem maior proteção para o RN, reduzindo os casos de otite média, infecções respiratórias e gastroentéricas (SILVA et al.,2008).

Além disso, o LH garante em muitos casos, a sobrevivência de crianças que nascem sob condições especiais como prematuros e bebês com baixo peso (BRASIL, 2002).

Além das vantagens nutricionais e de proteção, a amamentação propicia o estabelecimento do vínculo afetivo, e é reconhecido que o contato direto mãe-bebê e a participação paterna durante o processo de lactação favorecem o desenvolvimento afetivo-emocional e social na infância (CARVALHO e PAMPLONA, 2001).

Rea (2004) ainda relata os benefícios da amamentação para lactante dentre eles: a redução do câncer de mama que sofre influencia também da duração da amamentação, fator de proteção para alguns tipos de cânceres ovarianos, recuperação do peso pré-gestacional e redução de fraturas por osteoporose.

2.2. Fisiologia da lactação

O LH se forma nas glândulas mamárias da espécie feminina, compostas por lóbulos alveolares, circundados por células mioepiteliais e tecido conjuntivo ricamente vascularizado contendo adipócitos e fibroblastos. As células secretoras dos alvéolos mamários sintetizam alguns componentes do leite e retiram outros do plasma sanguíneo (JALDIN e SANTANA, 2006).

A glândula mamária passa por distintas fases de desenvolvimento desde a vida embrionária até sua completa maturação e capacitação para a lactação, que chegará ao seu máximo na gravidez e lactação (REGO, 2001).

Durante a gravidez, as taxas de hormônios estrogênicos, progesterona e prolactina aumentam progressivamente no sangue. Esses hormônios, em conjunto com outros (hormônios do crescimento, hidrocortisona e insulina), exercem ação morfogênica sobre as glândulas mamárias, preparando-as

anatomicamente para a lactação e promovendo o desenvolvimento do sistema lóbulo-alveolar que é responsável pela secreção do leite. O hormônio essencial para a secreção láctea é a prolactina. Após o parto, com a saída da placenta, a taxa de hormônios estrogênicos e progesterona caem subitamente no sangue, enquanto a taxa da prolactina continua elevada, estimulando fortemente a secreção do leite (REGO, 2001). As células mioepiteliais ao serem estimuladas pela oxitocina promovem a contração dos alvéolos promovendo a ejeção do leite (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003).

A secreção da grande variedade de componentes do LH segue uma série de etapas como absorção ou síntese, modificação e secreção realizada pelas células secretoras da glândula mamária (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003).

A água é secretada seguindo um gradiente de concentração. Alguns minerais e pequenas moléculas como a glicose e aminoácidos, vindos do plasma, são transportados no citoplasma a partir da membrana basal por meio de transportadores específicos. As proteínas secretadas no leite podem ser sintetizadas pelas células secretoras ou virem do espaço intersticial e ainda da circulação sanguínea e podem ser modificadas no citoplasma. Estes compostos são secretados na membrana apical por meio de exocitose e constituem a fase aquosa e as micelas de caseína do leite (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003).

Os lipídeos são sintetizados sobre a superfície do retículo endoplasmático liso, na região basal das células alveolares, a partir de ácidos graxos e glicerol, e são estocados na forma de gorduras citoplasmáticas envolvidas por algumas proteínas lipossolúveis (MATHER e KEENAN, 1998). Essas gotículas de gordura migram para a região apical das células alveolares e são então secretadas (MATHER e KEENAN, 1998; MCMANAMAN e NEVILLE, 2003). No processo de secreção, as gotículas de gordura são envolvidas pela membrana plasmática formando os glóbulos de gordura do leite (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003).

Alguns componentes plasmáticos e leucócitos podem ser encontrados no LH e chegam ao lúmen da glândula mamária através do transporte paracelular (MCMANAMAN E NEVILLE, 2003).

A Figura 1 representa o processo de formação e secreção do leite.

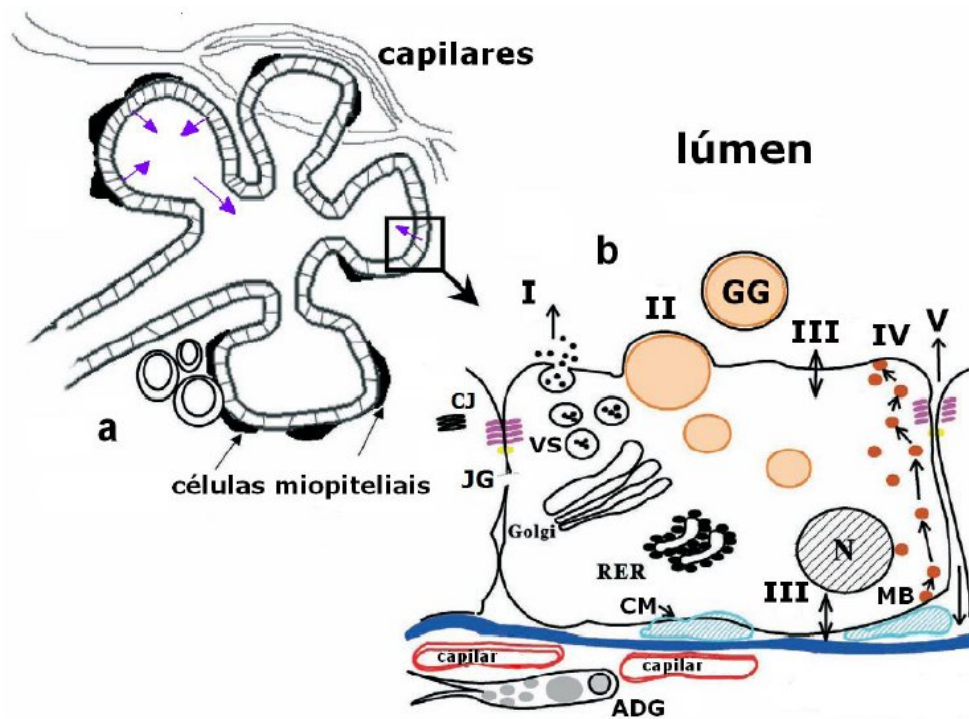


Figura 1. Diagrama dos alvéolos mamários e das células alveolares no processo de formação e secreção de leite. (a) As setas azuis indicam o caminho de secreção do leite pelos alvéolos mamários. (b) Os caminhos de I a V descrevem a secreção de água, minerais, lactose e proteínas sintetizados pelas células secretoras; a secreção dos glóbulos de gordura do leite; o processo de alguns minerais e pequenas moléculas vindos do plasma; a secreção de proteínas e imunoglobulinas originadas da circulação sanguínea; e o transporte paracelular de compostos plasmáticos e leucócitos; respectivamente. VS: vesículas secretoras; RER: retículo endoplasmático rugoso; MB: membrana basal; N: núcleo; GG: glóbulos de gordura; CJ: complexo juncional; JG: junções do tipo gap; CM: células mioepiteliais; ADG: adipócitos depletados de gordura.

Fonte: Adaptado de MCNAMAN e NEVILLE, 2003.

2.3. Denominações do leite humano de acordo com o período de lactação

Considerando-se as alterações na composição do LH ao longo da lactação o mesmo possui diferentes denominações: colostro, leite de transição

(LT) e leite maduro (LM). Coloostro é a secreção inicial (1 a 7 dias após o parto); leite de transição (8 a 21 dias após o parto) e leite maduro (a partir de 3 semanas após o parto) (PICCIANO, 1998).

O colostro é o primeiro produto da secreção láctica da nutriz e permite a boa adaptação fisiológica do RN à vida extrauterina (LAMOUNIER et al., 2001). É um fluido viscoso, de coloração amarelada devido ao seu elevado teor de beta-caroteno, acumulado nas células alveolares nos últimos meses de gestação e secretado nos primeiros dias após o parto. É rico em imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos, fatores tróficos, substâncias imunomoduladoras e anti-inflamatórias (EUCLYDES, 2005). Quando comparado ao leite maduro, o colostro é mais viscoso, possuindo concentrações mais elevadas de proteínas, minerais, carotenoides e vitaminas lipossolúveis, particularmente A e E, bem como menores teores de lactose, lipídeos e vitaminas do complexo B (CASEY et al., 1986). O conteúdo energético do colostro oscila em torno de 58 Kcal/100 mL, em contraste com 71 Kcal/100 mL existentes no leite maduro (LAMOUNIER et al., 2001).

No leite de transição o teor de proteínas e minerais é gradativamente reduzido ao passo que o de gorduras e carboidratos aumenta, até que as características do leite maduro sejam atingidas (EUCLYDES, 2005).

Embora uma transição ainda ocorra lentamente na composição do LH no período de 30 dias após o parto, convencionou-se definir como leite maduro aquele produzido 21 dias após o parto (PICCIANO, 1998). O leite maduro é um líquido menos viscoso que o leite de vaca e o colostro humano, mas contém todos os nutrientes que a criança precisa para um desenvolvimento adequado (BRASIL, 2001).

A Tabela 1 mostra as denominações do LH de acordo com o período de lactação segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), incluindo a denominação de “Leite de mãe de prematuro”.

Tabela 1. Denominações do leite humano conforme o período de lactação

Denominação	Período de Lactação
Colostro	Menos de 7 dias após o parto
Leite de transição	7 a 14 dias após o parto
Leite Maduro	Mais de 14 dias após o parto
Leite de mãe de prematuro	Idade gestacional inferior a 37 semanas

Fonte: ANVISA, 2008.

O leite da mãe de um prematuro contém grande quantidade de proteínas, sódio, cloreto e baixo conteúdo de lactose (GROSS et al., 1981). Apresenta ainda, maiores concentrações de nitrogênio, ácidos graxos de cadeia média, cálcio e fósforo, em relação ao colostro produzido por mães de RNs a termo. Com o tempo o leite de mãe de prematuro vai evoluindo e tornando-se semelhante ao leite maduro das mães dos RNs não prematuros (ATKINSON et al., 1981; BARROS e CARNEIRO-SAMPAIO, 1984).

2.4. Composição química do leite humano

A composição do LH tem sido tema de diversos estudos e sabe-se hoje que este leite não é um fluido uniforme e estável, mas sim uma secreção de composição variável, sendo considerado como um alimento completo (BRASIL, 2002).

O leite de diferentes mamíferos difere na composição e reflete as necessidades fisiológicas de cada espécie, assegurando aos seus descendentes sobrevivência, crescimento e desenvolvimento ótimos (ANDERSON, 1985).

Dentre os fatores que podem influenciar tanto na composição quanto no volume da secreção láctea, destacam-se: os genéticos, a nutrição materna, as técnicas de extração, a administração ao bebê as fases de lactação (CORRÍA, 2005).

As três frações presentes no leite humano também podem influenciar na sua composição, sendo essas frações classificadas em: emulsão, suspensão e solução. A fração emulsão corresponde à fase lipídica do leite humano, na qual concentram-se os óleos, as gorduras, os ácidos graxos livres, as vitaminas e demais constituintes lipossolúveis. A fração suspensão refere-se à fase suspensa do leite humano, na qual as proteínas e quase a totalidade do cálcio e do fósforo encontram-se presentes na forma micelar, constituindo uma suspensão coloidal. A fração solução inclui todos os constituintes hidrossolúveis como vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas de soro, enzimas e hormônios (LAMOUNIER et al., 2001).

O LH possui composição balanceada, sendo por isso considerado o melhor alimento para lactentes. Ele oferece energia e nutrientes necessários e

em quantidades apropriadas, além de proteger contra infecções virais e bacterianas. Por ser destinado à alimentação humana possui uma composição em que as reações alérgicas raramente ocorrem com o seu uso (LAMOUNIER; et al., 2001).

A Tabela 2 representa os principais componentes químicos do leite humano.

Tabela 2. Composição química do leite humano

Variáveis	Composição por litro
Energia	580 cal
Lactose	72 g
Proteínas	10,5 g
Lipídeos	39 g
Vitamina A	670 µg
Vitamina D	0,55 µg
Vitamina E	2,3 mg
Vitamina K	2,1 µg
Tiamina	0,2 µg
Riboflavina	0,35 mg
Niacina	1,5 mg
Ácido Fólico	85 µg
Ferro	0,3 mg
Vitamina B6	93 µg
Ácido ascórbico	40 mg
Cálcio	280 mg
Fósforo	140 mg
Cloreto	420 mg
Sódio	180 mg

Fonte: EUCLYDES, 2000.

2.4.1. Água

O LH apresenta aproximadamente 87,5% de água em sua composição, quantidade esta suficiente para suprir as necessidades hídricas do bebê, salvo em casos de diarreia ou vômitos. Além disso, ela desempenha papel fundamental na regulação da temperatura corpórea. Na água estão dispersos

compostos nitrogenados não proteicos, carboidratos, minerais, fatores de proteção e vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e do complexo B) (LAMOUNIER et al., 2001; MOURA 2002).

2.4.2. Proteínas

Entre o leite dos mamíferos, o LH possui o menor teor de proteínas totais, sendo compatível com o crescimento relativamente lento do RN (NASCIMENTO e ISSLER, 2003). O conteúdo proteico no LH é equivalente a aproximadamente 1/3 de proteína encontrada no leite de vaca (AKRÉ, 1990).

As proteínas fornecem de 6 a 7% da energia obtida pelo consumo do LH e podem ser divididas em duas classes: as proteínas do soro e a caseína. As proteínas do soro formam coágulos macios, em flocos, fáceis de digerir; a caseína forma um coágulo duro e difícil de digerir no estômago do bebê (TRAHMS, 2002). No LH a relação caseína/proteínas do soro é de aproximadamente 40/60, enquanto que no leite de vaca esta relação é estimada em 80/20 (LÖNNERDAL, 2003).

As proteínas do soro, em concentração média de 0,7 g/100mL no LH maduro, compreendem um grupo diverso de substâncias, como α lactoalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, albumina e enzimas (LÖNNERDAL, 1985).

A α -lactoalbumina é de extrema importância para o lactente por apresentar elevado teor nutricional devido sua composição em aminoácidos. O LH maduro apresenta cerca de 0,26 g/100mL de α -lactoalbumina e não apresenta β -lactoglobulina, presente no leite de vaca, sendo esta última responsável pelo aparecimento de alergias (LÖNNERDAL, 1985). A α -lactoalbumina é necessária também para a síntese de lactose na glândula mamária (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2006).

A lactoferrina é uma glicoproteína ligante do ferro e está presente no LH maduro em concentração de 0,17 g/100mL. Ela é responsável por quelar Fe^{3+} essencial para a multiplicação de micro-organismos patogênicos, tendo assim ação bacteriostática para esses micro-organismos no trato gastrointestinal (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2006). No metabolismo de bactérias bífidas a lactoferrina está envolvida na transferência de ferro diretamente para o micro-organismo (BEZKOROVAINY; 1977; LÖNNERDAL, 1985; MILLER-

CATCHPOLE et al., 1997).

A lisozima é encontrada em uma concentração de 0,040 g/100mL no LH maduro. Ela é capaz de degradar peptídeoglicanos da parede de bactérias gram-positivas e possui ação bactericida em algumas bactérias gram-negativas (CALIL et al., 1991; CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2006; LÖNNERDAL, 1985).

As imunoglobulinas presentes no leite são compostos que apresentam funções imunológicas que participam do sistema de defesa do organismo (CALIL et al., 1991).

A IgA (Imunoglobulina A secretória) representa cerca de 90% das imunoglobulinas presentes no colostro materno e LH maduro, sendo suas concentrações médias, nestas duas fases, de 1,740 g/100mL e 0,1g/100mL, respectivamente, sendo que grande concentração encontrada no colostro humano contribui para o seu elevado teor proteico nessa fase, protegendo o RN de infecções e alergias (CALIL et al., 1991).

As IgM (Imunoglobulina M) e IgG (Imunoglobulina G), estão presentes no LH em quantidades bem menores do que a IgA, com maiores concentrações no colostro (CALIL et al., 1991).

Algumas evidências mostram que a presença de imunoglobulinas no LH pode contribuir na diminuição do risco de algumas doenças como diabetes melitus do tipo 1, linfomas, doenças de Crohn, além de possuir um papel importante na nutrição do prematuro no período pré natal (VINAGRE, 2002).

Além disso, o LH fornece todos os aminoácidos essenciais (isoleucina, lisina, leucina, triptofano, treonina, metionina, fenilalanina e valina), além de outros não essenciais, sendo os sulfurados (taurina, metionina e cisteína) em alto teor e os aromáticos (tirosina) em baixo teor, uma vez que o RN possui pouca enzima disponível para metabolização destes últimos (LONNERDAL, 2000).

2.4.3 Lipídeos

Os lipídeos são a fonte principal de calorías (energia) para o bebê, sendo que o nível de gordura do LH pode ser afetado pela dieta da mãe. Além disso, a gordura do LH contém ácidos graxos de cadeia longa, necessários para o desenvolvimento do cérebro. As enzimas do LH pré digerem a gordura,

de modo que ela fica disponível ao bebê como energia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993).

Os lipídios apresentam-se na forma de glóbulos de cerca de 4 µm de diâmetro, em emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por uma membrana contendo fosfolipídios e proteínas (CALIL et al., 1991). Esse componente é sintetizado pelas células secretoras dos alvéolos mamários, sendo essa síntese estimulada pelo esvaziamento do seio materno durante a amamentação, e pela secreção de prolactina no lóbulo anterior da glândula pituitária (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003).

O LH maduro contém de 3g/100mL a 4g/100mL de lipídeos, dentre os quais 97% são triacilgliceróis, e o restante corresponde a pequenas quantidades de fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos livres (CALIL et al., 1991). Aproximadamente 60% da estrutura dos triglicerídeos são compostos por ácido palmítico esterificado na posição n-2, o que melhora a absorção das gorduras. Os ácidos graxos que compõem os triglicerídeos do leite podem ser provenientes da dieta, sintetizados pelo fígado, ou oriundos de ácidos graxos livres (lipólise do tecido adiposo), ou ainda, originados da síntese na glândula mamária (ANDERSSON et al., 2007).

Existem diferenças com relação ao teor de gordura nos diferentes períodos de lactação do LH. Ao longo de uma mesma mamada também ocorrem mudanças na concentração de gordura no leite. Considerando-se uma mamada com início, meio e fim, verificamos que no início é fornecida ao lactente a fração solução com menor conteúdo energético e somente no final da mamada, na fração emulsão, há maior conteúdo de gordura secretado (HECK, 2002).

2.4.4 Carboidratos

O principal carboidrato presente no LH é a lactose que está presente em concentrações mais baixas no colostro que no leite maduro. A lactose fornece 42% da energia do LH (TRAHMS, 2002).

Os outros carboidratos são representados pela glicose, galactose, oligossacarídeos e em forma de glicoproteínas (CALIL et al., 1991).

Os oligossacarídeos agem em conjunto com a lactose para promover a multiplicação de bifidobactérias no intestino, levando à queda do pH local e

tornando o ambiente impróprio para o crescimento de bactérias patogênicas (CALIL et al., 1991).

2.4.5 Minerais

Os minerais são importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde dos tecidos corporais (AL-AWADI e SRIKUMAR, 2000).

São classificados em macroelementos o sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, entre outros, e microelementos ou elementos traços, o cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco e outros. As necessidades do organismo para os macroelementos são relativamente elevadas, enquanto que para os elementos traços, são baixas (QUEIROZ, 2001).

O cálcio é absorvido mais eficientemente devido à alta relação cálcio: fósforo (2:1) presente no LH. O cálcio atua na transmissão de impulsos nervosos, coagulação sanguínea, ativação de enzimas e confere rigidez ao esqueleto. O fósforo influencia em processos metabólicos, na formação de ossos, no sistema imune e na produção e armazenamento de energia (AKRÉ, 1990).

A alta biodisponibilidade de ferro no LH resulta em interações complexas entre os componentes presentes nesse leite e o organismo do RN, garantindo o aporte necessário à criança em AME nos seus seis primeiros meses de vida. Quase 70% do ferro presente no LH é absorvido, contra 30% do leite de vaca e 10% de fórmulas infantis (AKRÉ, 1990).

O magnésio, além da forma iônica, apresenta-se ligado à caseína (caseinato) e ao fosfato (citrato). O zinco é essencial ao organismo atuando em vários processos enzimáticos além de atuar como constituintes de membranas, sendo encontrado em grande quantidade no colostro, atendendo às necessidades do lactente (MOURA, 2002).

O manganês apresenta funções no metabolismo como ativação de enzimas neoglicogênicas, proteção de membranas mitocondriais e ativação da glicosiltransferase (AGGET, 2000).

Embora em pequena quantidade, o cobre, o selênio, o cromo, o molibdênio e o níquel desempenham papel fundamental no desenvolvimento e crescimento infantil (MOURA, 2002).

Lonnerdal (2000) afirma que a glândula mamária parece ter mecanismos específicos para regular a concentração de minerais e oligoelementos no leite, mesmo em condições especiais de variação da dieta e situações maternas.

2.4.6 Vitaminas

As principais vitaminas presentes no LH são: A, B1, B2, B6, C, E, K, niacina e ácido fólico. Em condições normais, as concentrações mostram-se adequadas às necessidades dos lactentes, embora possa variar com a nutrição materna (ALMEIDA e NOVAK, 1995).

A vitamina A, de extrema importância, possui uma maior concentração no LH do que no leite de vaca, sendo que a quantidade encontrada no colostro humano é maior que no leite maduro. A deficiência dessa vitamina no segundo ano de vida é mais frequente em bebês desmamados precocemente do que entre aqueles que ainda mamam (AKRÉ, 1990).

A concentração de vitamina K é maior no colostro e após duas semanas a microbiota que fornece a vitamina K se instala no intestino de bebês amamentados com LH (AKRÉ, 1990).

A vitamina D está presente em baixas concentrações no LH em todas as suas fases, e por muitos anos foi vista como insuficiente para as necessidades do bebê. Entretanto bebês amamentados com LH não apresentaram esta deficiência (AKRÉ, 1990).

De modo geral, as vitaminas são os componentes mais variáveis do LH, particularmente as vitaminas A e do complexo B. O principal fator que influencia o conteúdo das vitaminas no LH é o estado nutricional de vitamina da lactante. Geralmente, quando a dieta materna de vitaminas é muito baixa, os níveis de vitamina no LH também são baixos, e vice-versa (EUCLYDES, 2000).

2.4.7 Fatores bifidogênicos

A multiplicação de bifidobactérias no trato gastrointestinal é favorecida devido à presença de um carboidrato nitrogenado presente no LH chamado “fator bífido”. Essas bactérias, em meio rico em carboidratos produzem ácido láctico, ácido acético, traços de ácido fórmico e ácido succínico, ocorrendo

diminuição do pH intestinal, tornado assim o meio desfavorável ao crescimento de determinados micro-organismos patogênicos (REGO, 2002).

O efeito bifidogênico do LH, conhecido desde a década de 1920, foi relacionado aos oligossacarídeos na década de 1950 (COPPA et al., 2004), o que explica o fato de que a frequência de complicações intestinais são substancialmente menores em lactentes amamentados quando comparados a crianças que apresentam em sua dieta outros alimentos além do LH (BRUZZESE et al., 2006).

Os fatores bifidogênicos pertencem ao grupo de oligossacarídeos, presentes em quantidade elevada somente nas secreções lácteas humanas. (PENNA e NICOLI, 2001). Podemos encontrar uma variedade de 130 diferentes tipos de oligossacarídeos derivados da lactose, que formam uma complexa mistura de diferentes combinações. No LH os três principais oligossacarídeos são: o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -Dgalactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 3'-galactosil lactose); o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D glicopiranosose (cujo nome usual é 4'-galactosil lactose); e o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 6'-galactosil lactose), cujas estruturas são diferenciadas pelo tipo de ligação glicosídica, que são respectivamente β -1,3, β -1,4 e β -1,6 (MARTINS e BURKERT, 2009).

Esses oligossacarídeos proporcionam um efeito barreira junto à superfície da mucosa do intestino humano, contribuindo para minimizar a invasão e colonização de micro-organismos indesejáveis a esse órgão vital. Essa é considerada como sua principal ação benéfica para a saúde humana. Além disso, os oligossacarídeos estão entre as fibras que proporcionam efeito positivo na composição da microbiota intestinal quando são consumidos associados a micro-organismos probióticos, como *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp. (FOOKS e GIBSON, 2002). Eles são carboidratos que possuem ligações específicas em suas unidades que só podem ser utilizados por esse grupo de micro-organismos, podendo ser considerados, portanto, como prebióticos ou como fatores de crescimento que favorecem a implantação dessas bactérias no trato gastrintestinal do RN (PENNA e NICOLI, 2001).

A composição dos oligossacarídeos do LH não é igual para todas as lactantes. Assim, podem também ser esperadas diferenças na microbiota

intestinal do lactente (COPPA et al., 2004), sendo que para ROBERFROID (2007), somente os fruto-oligossacarídeos (FOS) e os galacto-oligossacarídeos (GOS), dentre os oligossacarídeos, possuem essas características comprovadamente prebióticas.

2.5 A microbiota do leite humano

O LH não é estéril antes da ordenha, mesmo quando coletado de forma asséptica. Isso levanta a possibilidade da diversidade microbiana apresentada nesse fluido influenciar a colonização inicial intestinal do neonato (PEREZ et al., 2007).

O LH é um meio de cultura para vários tipos de micro-organismos sendo um importante fator na iniciação e desenvolvimento da microbiota intestinal neonatal. Apresenta uma diversidade de micro-organismos que colonizam o intestino do lactente durante várias semanas após o nascimento. Estima-se que uma criança que consome cerca de 800 mL de leite por dia irá ingerir cerca de 8×10^4 a 8×10^6 bactérias comensais do LH durante a sucção (HEIKKILA e SARIS, 2003).

Vários estudos abordam a microbiota presente no LH como contaminante, mas poucos são encontrados com relação à caracterização da sua microbiota natural. As bactérias comumente isoladas a partir deste fluido biológico incluem os estafilococos, estreptococos, micrococcos, lactobacilos, enterococos, bifidobactérias e são consideradas como componentes da microbiota natural do LH (GUEIMOND, 2007; MARTIN et al, 2004). Acredita-se que o LH seja uma excelente fonte de bactérias potencialmente probióticas para o intestino infantil (MARTIN, 2007).

A palavra probiótico deriva do grego e significa “para vida”, sendo o antônimo de antibiótico, “contra vida” Probióticos são micro-organismos vivos, que se administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HAMILTON-MILLER et al., 2003).

A presença de bactérias probióticas como bifidobactérias e lactobacilos no LH são fatores importantes na maturação do sistema imune e na proteção contra a proliferação de micro-organismos patogênicos (GUEIMONDE et al., 2007). Esses gêneros de bactérias contêm estirpes com potencial para

serem usadas como bioterapêuticos (MARTIN et al., 2007).

A microbiota bífida, por exemplo, atua como uma barreira viva impedindo a instalação de patógenos no organismo dos lactentes. A velocidade de crescimento aliada à capacidade de metabolizar rapidamente a lactose resulta na produção de ácido com redução do pH do intestino, o que dificulta a proliferação da microbiota patogênica (BLAUT, 2002; GUARNER, 2002).

Vários lactobacilos apresentam características comprovadamente probióticas e pesquisas demonstraram a eficiência do uso deste micro-organismo na estimulação do sistema imune (ISOLAURI et al., 2004).

Assim a caracterização da microbiota do LH pode fornecer informações que corroborem a importância do aleitamento materno na saúde do RN. As bactérias presentes no leite humano se isoladas e adicionadas ao leite depositado nos BLHs após o processo de pasteurização irão exercer efeitos benéficos à saúde dos lactentes que receberem esse leite, sendo que essa microbiota atuará na colonização inicial da microbiota intestinal do RN nessa fase inicial de sua vida.

2.6 A colonização inicial do trato gastrointestinal do recém-nascido e sua relação com aleitamento materno exclusivo

O intestino humano é o habitat natural de uma ampla e dinâmica comunidade bacteriana adaptada a estas condições (VRIEZE et al., 2010). A microbiota presente representa uma enorme biomassa, com pelo menos 10^{14} células microbianas dominadas por bactérias anaeróbias e compostas por 500 a 1000 diferentes espécies (XU e GORDON, 2003) que coexistem em equilíbrio dinâmico (MUSSO et al., 2010) e promovem uma relação de simbiose com o hospedeiro (SANZ et al., 2004).

Santos (2010) define uma microbiota intestinal saudável aquela que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (TG). Para o autor a microbiota intestinal é capaz de formar uma barreira contra os micro-organismos invasores, estimulando os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os patógenos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais.

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo que se inicia com a colonização do TG, e se estabelece gradualmente pela implantação de diferentes estirpes de micro-organismos onde interações simbióticas e antagonicas acontecem simultaneamente (BENGMARK, 1998).

O TG possui o maior número e a maior diversidade de espécies de bactérias que colonizam o corpo humano. As bactérias são encontradas em todo TG, porém com uma distribuição heterogênea. No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana devido à ação bactericida do suco gástrico, da bile, da secreção pancreática e pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. No cólon, as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, ao peristaltismo lento e ao abundante suprimento nutricional. A população microbiana do cólon alcança 10^{10} a 10^{12} micro-organismos por grama de conteúdo luminal, e supera em número o total das células eucarióticas presentes no corpo humano (GUARNER e MALAGELDA, 2003; TANNOCK, 1999).

A colonização intestinal do RN é essencial para a maturação, estabelecimento e manutenção da barreira da mucosa intestinal (PENDERS et al., 2006). Existe uma evidência crescente de que esta colonização microbiana inicial do intestino tem um forte efeito sobre a saúde do lactente, estando relacionada com as condições de saúde do indivíduo em períodos posteriores da vida (KALLIOMAKI et al., 2001).

Por ocasião do nascimento, o intestino dos seres humanos é estéril. Entretanto, sua colonização bacteriana começará durante o parto e, em breve, outros micro-organismos serão introduzidos juntamente com os primeiros alimentos. Em condições normais, a microbiota intestinal materna funcionará como a principal fonte de bactérias que colonizarão efetivamente o TG do RN (TANNOCK, 1999).

Portanto, é de se perguntar neste momento, de onde o RN obtém os micro-organismos que constituirão a sua microbiota intestinal normal e quais são os fatores que podem facilitar ou, ao contrário, dificultar a obtenção e instalação desses componentes no TG.

A mãe é a primeira fonte desses micro-organismos, onde durante o parto normal o RN entra em contato com os ecossistemas vaginal e fecal da mesma (PENNA e NICOLI 2001).

As mudanças na microbiota que coloniza o TG também guardam uma relação direta com as variações alimentares do neonato. Nesse caso a segunda fonte dessa microbiota está relacionada com primeiros alimentos consumidos pelo RN sendo o LH de extrema importância (RUBATELLI et al., 1998; YOSHIKA et al., 1983).

Já foi comprovado que crianças alimentadas com LH apresentaram uma microbiota colônica rica em bactérias do gênero *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp. Após o desmame e em crianças alimentadas com fórmulas infantis, encontra-se uma microbiota semelhante àquela de um adulto, com predominância de *Bacteroides* spp e outros micro-organismos gram negativos (GUARNER e MALAGELADA, 2003; PENDERS et al., 2006; SJÖGREN et al., 2009a; SJÖGREN et al., 2009b).

O LH possui uma carga microbiana variável originada dos ductos lactíferos, pele circundante, mamilos e mãos (ALMEIDA, 1986), portanto, acredita-se que a microbiota intestinal do RN reflete a composição microbiológica do LH (HEIKKILA e SARIS, 2003).

Dentro da diversa microbiota encontrada no LH pode-se encontrar estirpes probióticas que terão uma diversidade de funções para a saúde do lactente (VILJANEN et al., 2005). Entre esses grupos destacam-se os grupos *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp

Bifidobacterium spp promove diversos efeitos benéficos ao hospedeiro tais como: fermentação de substratos resultando na produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); redução do pH que exerce ação bactericida; diminuição dos níveis séricos de amônia pela hidrólise de proteínas; participação na produção de vitaminas do complexo B (BLAUT, 2002; GUARNER, 2002). As bifidobactérias possuem ainda a capacidade de exercer um efeito inibitório sobre o crescimento de outras espécies, o que leva a um menor risco de invasão e colonização por bactérias patogênicas para o organismo humano. Isso ocorre por meio da produção de compostos inibidores como ácidos orgânicos e bacteriocinas, competição por nutrientes e sítios de adesão no epitélio intestinal, e modulação da resposta imune (FOOKS e GIBSON, 2002).

Os benefícios à saúde humana relacionada ao consumo de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp tem sido relatado em vários estudos. Pesquisas demonstraram a eficiência do uso desse micro-organismo na estimulação do

sistema imune (ISOLAURI et al., 2004), na utilização da lactose por indivíduos lactase não persistentes (GRIFFIN et al., 2002; LEVRI et al., 2005), na redução de inflamações e reações alérgicas (VILJANEN et al., 2005) e na prevenção de câncer de cólon (WOLLOWSKI et al., 2001).

Bifidobactérias e lactobacilos protegem as crianças de alergias e algumas constatações mostram que muitas crianças que desenvolveram alergias apresentavam microbiota intestinal significativamente menos colonizada com *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium adolescentis* e mais colonizada por *Clostridium difficile*, durante seus primeiros dois meses de vida (SJÖGREN et al., 2009a; SJÖGREN et al., 2009b).

Portanto acredita-se que o LH é uma fonte constante de bactérias comensais para o intestino do neonato, porém, não se sabe ao certo sua origem e sugere-se que algumas espécies possam ser transferidas do intestino materno para as glândulas mamárias, e ao serem transferidas ao RN durante a amamentação natural iniciarão a colonização do TG (MARTIN et al., 2004).

2.7 Bancos de leite humano

O LH preenche perfeitamente as demandas nutricionais, imunológicas e afetivas do RN. Entretanto, existem situações especiais na qual a criança é incapaz de sugar o peito da mãe como prematuros, crianças portadoras de patologias respiratórias, cardíacas, gastrintestinais, entre outras (SILVA et al., 2008). Há ainda o fato de algumas mães que, por algum problema fisiológico ou emocional não conseguem produzir leite. Além disso, existe o problema de alergia causado ao RN pelo consumo do leite oriundo de outros animais (SERAFINI et al., 2003).

Sendo assim, é de extrema importância dispor de LH em quantidades que permitam o atendimento nos momentos de urgência a todos os lactentes que, por motivos clinicamente comprovados, não disponham de aleitamento ao seio, situação essa para a qual os BLHs foram criados (NOVAK et al., 2002).

Os BLHs são considerados centros de referência para o apoio, estímulo e promoção do aleitamento materno, inclusive realizando a coleta, processamento e distribuição do LH, os quais seguem as normas para

funcionamento de BLHs do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A Figura 2 representa o fluxograma do funcionamento de um BLH.

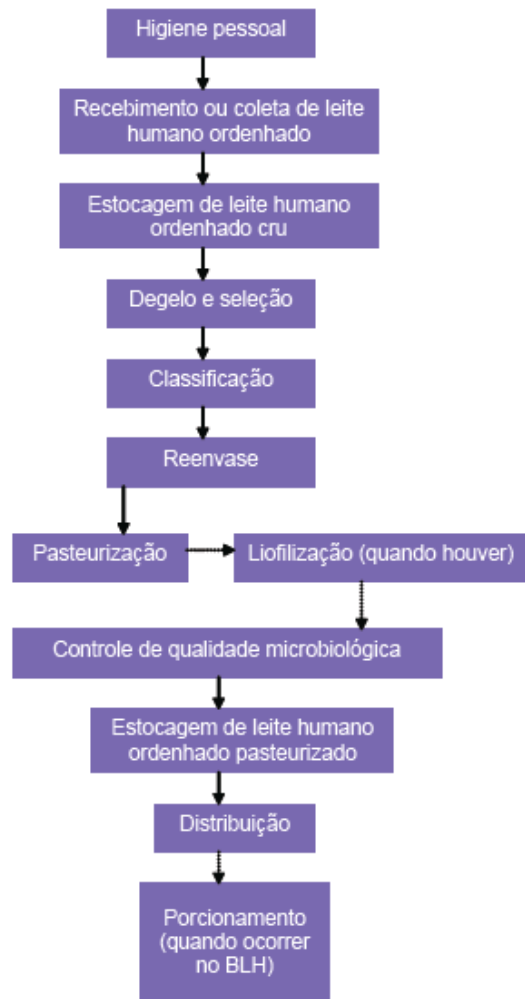


Figura 2. Fluxograma do funcionamento de um banco de leite humano. Fonte: ANVISA, 2008.

Os BLHs possuem ainda o objetivo de apoiar, ajudar e acompanhar mãe e filho no processo de amamentação, atender e orientar as doadoras de leite, gestantes e nutrizas, e solucionar problemas com a alimentação de RN em situações fisiológicas especiais como prematuridade, baixo peso, portadores de deficiência, perturbação gástrica, entre outros (BORGIO et al., 2005; MELO, 2005; SCARSO et al., 2006).

Esses bancos possuem uma grande responsabilidade ao disponibilizarem aos recém-nascidos um leite oriundo de outras mães. Nesse caso, torna-se de extrema importância o conhecimento das características do

LH em cada período para que o neonato possa receber o leite com as características ideais, ou seja, específicas de acordo com o período em que o mesmo se encontra, atendendo dessa forma suas necessidades.

Além disso, algumas práticas para garantir a qualidade do leite recém-ordenhado são realizadas nesses bancos, sendo o controle da sua acidez uma delas. A acidez em graus Dornic do leite humano é a acidez titulável do leite humano ordenhado expressa em °D (ANVISA, 2006). O leite humano recém-ordenhado, caso titulado imediatamente após a ordenha, apresenta-se praticamente livre de ácido láctico, e sua acidez total considerada original, com valores oscilando entre 1,0 e 4,0 °D está relacionada à presença de proteínas, citratos, fosfatos e CO₂. À medida que sua microbiota encontra condições favoráveis para o crescimento, ocorre a produção de ácido láctico e a consequente elevação da acidez (ALMEIDA et al., 2005; NOVAK e CORDEIRO, 2007).

Nos BLHs, as amostras tituladas que apresentam acidez inferior a 8°D são novamente envasadas para posterior pasteurização e aquelas cuja acidez encontra-se acima de 8°D são descartadas (FIOCRUZ, 2006). Esse procedimento é realizado pelo fato de que a acidez elevada pode estar relacionada com elevadas contagens de micro-organismos (NOVAK e CORDEIRO, 2007).

Outro fator que deve ser controlado no LH doado é a contaminação oriunda do ambiente externo, após a ordenha. O leite ordenhado e doado para os BLHs é um ótimo meio de cultura para vários tipos de micro-organismos, pois o mesmo não dispõe de nenhuma barreira física que impeça a penetração de micro-organismos contaminantes (NOVAK et al., 2002).

O desenvolvimento adequado de estratégias para eliminar a presença desses contaminantes e para prevenir a transmissão de doenças de mãe para filho pelo do LH, principalmente o vírus HIV tipo 1 (HIV-1), torna-se muito importante, principalmente em populações carentes. O tratamento térmico é uma das opções sugeridas pela OMS, e demonstra ser uma estratégia simples e barata (HARTMANN et al., 2006).

Sendo assim, o LH ordenhado, sofre um processo de pasteurização (62,5 °C por 30 minutos) nos BLHs antes de sua distribuição aos interessados. A pasteurização consiste no tratamento térmico e resfriamento rápido do LH,

com o objetivo de inativar 100% dos micro-organismos patogênicos e 99,9% da microbiota contaminante (BRAGA e PALHARES, 2007; BRASIL, 2001a).

A pasteurização do leite utilizada nesses bancos, embora garanta a sua qualidade microbiológica, resulta na perda ou redução de componentes nutricionais e imunológicos como minerais (COSTA et al., 2003), IgA (BRAGA e PALHARES, 2007), aminas bioativas (ARAÚJO, 2003) entre outros.

Causa ainda, a eliminação da microbiota presente no LH que está diretamente relacionada com a colonização do TG do RN. Portanto, a suplementação das próprias bactérias presentes no LH aos BLHs após o processo de pasteurização atuaria contribuindo na reposição de uma microbiota benéfica ao lactente.

Atualmente, algumas hipóteses têm sido apresentadas com o intuito de justificar a diversidade de bactérias presente no LH e suas vias de aquisição.

Como exemplo, sugere-se que algumas espécies possam ser transferidas do intestino materno para as glândulas mamárias, e ao serem transferidas ao RN durante a amamentação natural iniciarão a colonização do TG (HEIKKILÄ e SARIS, 2003; MARTIN et al., 2004).

Perez et al., (2007) sugerem que componentes bacterianos derivados do intestino são transportados para a mama da lactante no interior de células mononucleares, caracterizando esta via endógena de composição da microbiota do LH. Acredita-se que através dos leucócitos de leite, que são células que migraram a partir do intestino para as glândulas mamárias, algumas espécies microbianas presentes no LH possam através desse circuito ser transportados para o seio materno sem qualquer efeito maléfico sobre a saúde materna.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

3.1.1. Pesquisar e quantificar os principais grupos microbianos presentes no leite humano, determinar as características físico-químicas do mesmo, em diferentes períodos de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro); Determinar possíveis características de segurança de isolados obtidos;

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Observar a biodiversidade da microbiota do leite humano nos diferentes períodos de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro);

3.2.2. Pesquisar e quantificar os seguintes grupos de micro-organismos no leite humano: i) anaeróbios; ii) coliformes totais; iii) fungos filamentosos e não filamentosos; iv) mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos; v) *Bacteroides* spp; vi) *Bifidobacterium* spp; vii) *Clostridium* spp;; viii) *Enterococcus* spp; ix) *Escherichia coli*; x) *Staphylococcus aureus*; xi) *Lactobacillus* spp; nos diferentes períodos de lactação;

3.2.3. Caracterizar a capacidade de produção de hemolisina dos isolados obtidos dos meios MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) e Rogosa (*Lactobacillus* spp);

3.2.4. Determinar a acidez, o pH, o conteúdo de proteínas, lipídeos, umidade, cloretos e cinzas no leite humano nos diferentes períodos de lactação;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Culturas Láticas (LCL) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Culturas Láticas (LCL) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.1. Seleção das doadoras voluntárias

Foram selecionadas 10 (dez) lactantes doadoras voluntárias que apresentaram as seguintes características:

- a) idade gestacional de termo;
- b) procedentes de parto normal ou cesárea;
- c) com amamentação materna exclusiva;
- d) com secreção láctea superior às necessidades de seu filho e que se dispuseram a doar o excesso, por livre e espontânea vontade;
- e) estavam em perfeitas condições de saúde, não sendo portadoras de doenças crônicas;
- f) não fizeram o uso de antibióticos ou outros medicamentos na semana de coleta ou anterior a cada coleta;
- g) não apresentavam dificuldades na amamentação;
- h) aceitaram participar da pesquisa;
- i) encontravam-se nos períodos de amamentação estipulados para a coleta das amostras;

As doadoras foram abordadas no Hospital São Sebastião, Viçosa-MG, onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III), proposto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da

Universidade Federal de Viçosa. Este Estudo, protocolo nº 157/2011 foi avaliado e aprovado por esse Comitê.

4.2. Coleta das amostras de leite humano

As mães doadoras foram acompanhadas e orientadas a procederem à higiene das mãos e dos mamilos antes de cada coleta de acordo com o descrito no Manual de Funcionamento dos Bancos de Leite Humano (ANVISA, 2008). No procedimento de coleta das amostras, as mesmas realizaram:

- a) antissepsia das mãos e antebraços com água e sabão;
- b) antissepsia dos mamilos com água;
- c) secagem das mãos e mamilos com toalha limpa;
- d) massagem circular da base da mama em direção ao mamilo;
- e) estímulo suave dos mamilos estirando-os ou rodando-os entre os dedos;
- f) colocação do polegar sobre a mama, onde termina a aréola, e dos outros dedos abaixo, na borda da aréola;
- g) compressão da aréola e mama por meio dos dedos polegar e indicador;
- h) extração do leite, desprezando os primeiros jatos;
- i) repetição do movimento de forma ritmada, mudando a posição dos dedos ao redor da aréola para esvaziar todas as áreas;
- j) após a ordenha, adição de pouca quantidade de leite nos mamilos;

As amostras de leite humano (aproximadamente 50 mL) foram coletadas com bombas manuais individuais na própria residência das mães em cinco períodos diferentes: quinto dia após o parto (colostró), décimo quinto dia após o parto (leite de transição), trigésimo dia após o parto (leite maduro), sexagésimo dia após o parto (leite maduro) e nonagésimo dia após o parto (leite maduro), sendo acondicionadas em frascos devidamente esterilizados, resfriados em caixas de isopor contendo gelo, e imediatamente transportadas para o LCL do BIOAGRO, onde foram submetidas as análises.

Nos frascos, foram anotados dados de identificação da doadora e da amostra, tais como: nome completo, data e horário da coleta.

O estudo incluiu 10 nutrízes, sendo coletadas 5 amostras de cada (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto) totalizando um número de 50 amostras analisadas.

4.3. Caracterização físico-química do leite humano

Foram realizadas análises de proteína, gordura, umidade, cinzas, cloretos, acidez e pH de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) e da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1998).

4.3.1. Determinação da acidez

A acidez foi determinada por meio da titulação da amostra de leite humano com solução padronizada de NaOH 0,1mol/L, sendo a acidez expressa em porcentagem de ácido láctico e convertida para °Dornic ($^{\circ}D = \% \text{ ácido láctico} \times 100$).

4.3.2. Determinação do pH

A determinação do potencial hidrogeniônico foi realizada diretamente com o auxílio do pHmetro digital GHK modelo W3B (Bel engineering), por meio da introdução do eletrodo na amostra.

4.3.3. Determinação do conteúdo de proteínas

O teor de nitrogênio total (% m/v) da amostra foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão 6,38 para determinação de seu conteúdo proteico.

4.3.4. Determinação do conteúdo de lipídeos

O conteúdo lipídico (% m/v) presente no leite humano foi determinado diretamente no butirômetro de Gerber. O método de Gerber se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, com posterior centrifugação e determinação do teor de gordura.

4.3.5. Determinação do conteúdo de água

Para a determinação do conteúdo de água foi utilizado o método

gravimétrico, sendo definida pela perda de peso da amostra, por secagem em estufa a 105 ± 2 °C, até massa constante.

4.3.6. Determinação do conteúdo de cinzas

O conteúdo de cinzas (% m/v) foi determinado pelo método gravimétrico após carbonização e incineração da matéria orgânica em forno mufla a 550 ± 10 °C.

4.3.7. Determinação do conteúdo de cloretos

O conteúdo de cloretos (% m/v) foi determinado por argentimetria imediatamente após a análise de cinzas, na qual adicionou-se ácido nítrico, carbonato de cálcio e solução de dicromato de potássio (5 %). Titulou-se com solução padronizada de nitrato de prata (0,1 mol/L) e calculou-se a porcentagem de cloreto de sódio na amostra.

4.4. Caracterização microbiológica do leite humano

As análises microbiológicas do leite coletado foram realizadas de acordo com “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (APHA, 2002) e “Standard Methods for the Examination of Dairy Products” (APHA, 2004).

As amostras foram analisadas imediatamente após a coleta, por meio do plaqueamento em meios específicos para os seguintes grupos microbianos: mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, anaeróbios, coliformes totais, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, fungos filamentosos e não filamentosos, *Lactobacillus* spp e *Staphylococcus aureus*.

Foram feitas diluições decimais sucessivas de 10^{-1} a 10^{-7} , em tubos com solução salina peptonada estéril. Alíquotas das diluições de interesse foram inoculadas em *Pour Plate* ou *Spread Plate*, seguidas de incubação de acordo com as exigências de cada grupo.

Os plaqueamentos foram realizados em duplicatas para cada diluição.

Para contagem, consideraram-se as placas que continham entre 25-250 colônias. No caso da utilização de Petrifilms, a contagem considerada foi de 15-150 colônias.

4.4.1. Contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos

A contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” (plaqueamento em profundidade) em placas de Petri, utilizando o meio Plate Count Agar (PCA) (APHA, 2004) seguida de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

4.4.2. Contagem padrão de micro-organismos anaeróbios

A contagem padrão de micro-organismos anaeróbios foi feita empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri, em meio Wilkins-Chalgren (WC) (APHA, 2004) seguida de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em anaerobiose (anaerobac, PROBAC BRASIL).

4.4.3. Pesquisa de fungos filamentosos e não filamentosos

A pesquisa de fungos filamentosos e não filamentosos foi realizada empregando-se a técnica “*Spread Plate*” (plaqueamento em superfície) em placas de Petri com a utilização do meio Potato Dextrose Agar (PDA) (APHA, 2004), acidificado com 1% (v/v) de ácido tartárico 10% (pH 3,5), seguida de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 a 5 dias.

4.4.4. Pesquisa de *Bacteroides* spp

A pesquisa de *Bacteroides* spp foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri, com a utilização do meio Wilkins-Chalgren (WC), adicionado de 4,6% (v/v) do antibiótico gamicina 120 mg diluído em 50 mL de água estéril (FUNED). Em seguida as placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em anaerobiose (Anaerobac, PROBAC BRASIL).

4.4.5. Pesquisa de *Bifidobacterium* spp

A pesquisa de *Bifidobacterium* spp foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri com a utilização do meio MRS modificado com adição de 1% (v/v) de cisteína 0,05% (CUNHA, 2006) e 5% (v/v) dos antibióticos NPNL (SHAH et al., 1997) seguida de incubação a 37 ± 1 °C por 48 horas em anaerobiose (Anaerobac, PROBAC BRASIL). A solução NPNL é composta de: Ácido nalidíxico, na concentração de 15 mg/L; sulfato de neomicina, 100 mg/L; cloreto de lítio, 300 mg/L; sulfato de paramomicina, 200 mg/L.

4.4.6. Pesquisa de *Clostridium* spp

A pesquisa de *Clostridium* spp foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri, com a utilização do meio Reinforced Clostridial Medium (RCM) (SANTOS et al, 2003) e incubação a 37 ± 1 °C por 48 horas em anaerobiose (Anaerobac, PROBAC BRASIL).

4.4.7. Pesquisa de *Enterococcus* spp

Para *Enterococcus* spp a pesquisa foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri, em meio Agar Bile Esculina (CAMARGO, 2005) seguida de incubação a 37 ± 1 °C por 48 horas.

4.4.8. Pesquisa de *Escherichia coli* e coliformes totais

A pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada utilizando-se as placas 3M™ Petrifilm (3M, USA).

As Placas 3M™ Petrifilm para contagem de *E.coli* e coliformes totais contêm nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile, um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador que facilita a enumeração da colônia.

Colônias de coliformes que crescem na placa Petrifilm produzem ácido, fazendo com que o indicador de pH torne a cor do gel vermelho mais escuro. O gás retido ao redor das colônias vermelhas indica coliformes confirmados.

A maioria das estirpes de *E.coli* (cerca de 97%) produz beta-glicuronidase resultando em um precipitado azul associado a colônia. O filme superior também retém o gás formado por *E.coli* que são fermentadores de lactose.

Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. As placas foram incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. A leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação para enumeração de coliformes totais, e 48 horas de incubação, para enumeração de *E. coli*.

A identificação de *E.coli* e coliformes totais pode variar para cada país, sendo que o método validado pela AOAC indica como *E.coli* as colônias azuis com gás retido e coliformes totais as colônias vermelhas com gás presentes na placa (Figura 3).

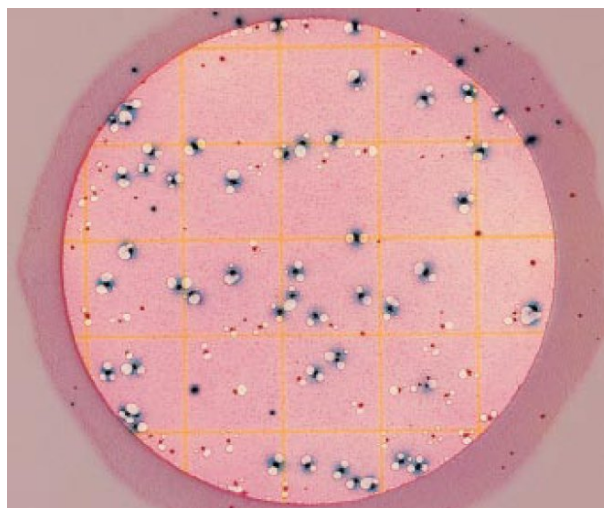


Figura 3. Unidades formadoras de colônia de *Escherichia coli* e coliformes totais em placa Petrifilm.

4.4.9. Pesquisa de *Lactobacillus spp*

A pesquisa de *Lactobacillus spp* foi realizada empregando-se a técnica “*Pour Plate*” em placas de Petri, usando Ágar Rogosa (ZAHOR et al., 2003) e incubação a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas sob anaerobiose (Anaerobac, PROBAC BRASIL).

4.4.10. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* foi realizada utilizando-se as placas 3M™ Petrifilm (3M, USA). O Petrifilm para *S.aureus* consiste em um meio de cultura pronto que contém um agente geleificante solúvel em água fria e um meio específico (Baird-Parker modificado) na placa seletivo e diferencial para *S. aureus*.

O mesmo procedimento realizado para coliformes totais e *E.coli* foi repetido para *S. aureus*.

As placas foram incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas e em seguida foi realizada a leitura da placa com enumeração das colônias típicas. Colônias vermelho-violetas rodeadas por uma área rosada são identificadas como *S.aureus* (Figura 4).

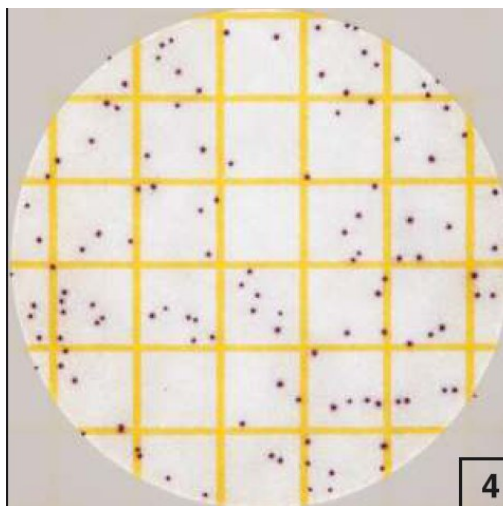


Figura 4. Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* em placa Petrifilm.

4.5. Observação da biodiversidade microbiana

4.5.1. Coloração de Gram

A fim de observar a diversidade microbiana detectando as principais morfologias dos micro-organismos presentes no leite humano nos diferentes

períodos de lactação, foi realizada para cada amostra de leite humano coletada a técnica de coloração de GRAM segundo metodologia de TORTORA et al., (2000).

Alíquotas de 0,01 mL da amostra de leite humano (diluição 10^{-1}) foram espalhadas em um retângulo de 1 cm² de superfície, demarcado sobre uma lâmina de microscopia comum previamente desengordurada com álcool, seca e flambada. Adicionou-se o leite sobre a lâmina, primeiro contornando o retângulo e depois preenchendo a área de maneira mais uniforme possível. Posteriormente, a lâmina foi colocada sobre uma chapa aquecida a 37°C para secagem e fixação da alíquota do leite. Após fixação e secagem as lâminas foram coradas pela técnica de coloração de Gram e os micro-organismos presentes foram observados em 10 diferentes campos em microscópio óptico, utilizando a objetiva com magnificação de 100x.

4.6. Isolamento das colônias

Após plaqueamento e contagem dos grupos de micro-organismos presentes no leite humano, foram isoladas 5 colônias de cada meio de cultura, considerando-se a mãe e o período analisado. Essas colônias foram submetidas à coloração de Gram (TORTORA et al., 2000) para verificação da pureza. As colônias foram mantidas congeladas a -80 °C em caldo MRS mais 50 % (v/v) de glicerol para *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp e em caldo BHI mais 50 % (v/v) de glicerol para *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp *Enterococcus* spp e *Staphylococcus aureus*.

4.7. Teste da atividade hemolítica

A produção de hemolisina ocorre devido ao requerimento de íons ferro, uma vez que este é um micronutriente requerido para a multiplicação dos micro-organismos patogênicos devido à sua participação como cofator de várias enzimas (HUSAIN, 2008). As BAL são relatadas como uma exceção entre os organismos vivos por não apresentarem requerimento de ferro para multiplicarem, sendo esta considerada uma vantagem ecológica no ambiente

natural em que competem com bactérias patogênicas (ELLI et al., 2000).

É de interesse, portanto, que essas bactérias (BAL) não produzam essa enzima, sendo a ausência da produção de hemolisina uma das várias características de bactérias probióticas.

Para verificação dessa característica nos isolados obtidos dos meios MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) e Rogosa (*Lactobacillus* spp), foi realizado o teste da atividade hemolítica de acordo com Maragkoudakis et al.,(2006). Os isolados obtidos e caracterizados como catalase negativos de acordo com a metodologia (HOLDEMAN et al.,1987) foram estriadas em ágar MRS suplementado com 5% de sangue humano. Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C por 48 horas sob condição de anaerobiose (anaerobac, PROBAC BRASIL).

A reação hemolítica foi verificada pela formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), pela formação de pigmento verde ao redor da colônia (α - hemólise) e pela ausência da produção de hemolisina (γ - hemólise). *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi utilizado como controle positivo.

Antes de cada análise, os isolados foram ativados três vezes consecutivas em caldo MRS (MAN et al., 1960) estéril e incubados a 37 °C, por 18 horas.

4.8. Análises estatísticas

Os valores encontrados para as análises físico-químicas e microbiológicas foram expressos em termos de média e desvio padrão. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para comparação das amostras de leite entre mães e entre os períodos de lactação

Para a compilação dos dados utilizou o programa *Excell* e para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Sigma Statistic for Windows versão 2.03* (FOX et al., 1994). O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Físico-química do leite humano

A tabela 3 representa os resultados expressos em média e desvio padrão das análises físico-químicas realizadas. Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) realizada encontra-se no ANEXO I.

Tabela 3. Média e desvio padrão das análises físico-químicas do leite humano em diferentes períodos de lactação

Variável	Período de lactação (dias após o parto)				
	5	15	30	60	90
	X*(DP)**	X(DP)	X(DP)	X(DP)	X(DP)
Proteína (% m/m)	1,87±0,22	1,62±0,18	1,36±0,12	1,14±0,33	1,14±2,21
Gordura (% m/m)	2,7±1,32	3,6±1,31	3,7±0,98	3,4±0,93	3,5±0,89
Umidade (% m/m)	87,94±2,11	87,54±1,79	87,46±1,31	87,8±3,37	87,44±2,51
Cloretos (% m/m)	0,25±0,02	0,15±0,02	0,12±0,02	0,11±0,02	0,11±0,01
Cinzas (% m/m)	0,37±0,08	0,29±0,05	0,18±0,05	0,26±0,1	0,26±0,04
pH	6,35±0,62	6,5±0,54	6,55±0,42	6,71±0,58	6,94±0,74
Acidez (°Dornic)	5,38±1,92	5,51±2,84	5,55±2,26	5,2±2,25	5,66±2,51

*média; **desvio padrão;

5.5.1. Acidez

Ao analisar a acidez dos leites coletados, para os períodos de lactação observa-se que ela não foi diferente significativamente ($p > 0,05$). Ao analisar essa mesma acidez entre o leite de diferentes mães conclui-se que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas. Estatisticamente essa acidez não

possui uma variação significativa ao longo do tempo. Porém, entre o leite de diferentes mães foi detectada essa diferença. Essa variação pode ser oriunda de diferentes contagens de micro-organismos em leites distintos com consequente produção de diferentes quantidades de ácido láctico.

As Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam a acidez ($^{\circ}$ D) das 10 amostras de leite coletadas nos diferentes períodos de lactação, seguida pela contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) afim de comparação.

Tabela 4. Valores Acidez ($^{\circ}$ D) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no colostro humano

Amostra	Acidez ($^{\circ}$ D)	Mesófilos aeróbios/ anaeróbios facultativos (UFC/ml)
1	4,41	$8,75 \times 10^2$
2	5,29	$9,25 \times 10^2$
3	2,64	$2,34 \times 10^5$
4	5,29	$1,33 \times 10^5$
5	5,29	$1,04 \times 10^3$
6	9,69	$2,55 \times 10^6$
7	5,29	$2,4 \times 10^4$
8	5,29	$4,2 \times 10^5$
9	3,52	$1,74 \times 10^4$
10	7,05	$5,75 \times 10^4$

Tabela 5. Valores Acidez ($^{\circ}$ D) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite de transição

Amostra	Acidez ($^{\circ}$ D)	Mesófilos aeróbios/ anaeróbios facultativos (UFC/ml)
1	3,52	$1,29 \times 10^3$
2	7,05	$2,47 \times 10^3$
3	3,52	$4,82 \times 10^5$
4	4,41	$3,0 \times 10^4$
5	2,2	$5,94 \times 10^6$
6	10,57	$1,62 \times 10^8$
7	8,81	$6,94 \times 10^7$
8	7,93	$2,22 \times 10^5$
9	3,52	$5,1 \times 10^2$
10	3,52	$1,56 \times 10^6$

Tabela 6. Valores Acidez ($^{\circ}\text{D}$) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (30 dias após o parto)

Amostra	Acidez ($^{\circ}\text{D}$)	Mesófilos aeróbios/ anaeróbios facultativos (UFC/ml)
1	3,52	$1,02 \times 10^3$
2	6,17	$1,04 \times 10^3$
3	6,17	$8,95 \times 10^4$
4	5,29	$9,55 \times 10^4$
5	3,52	$2,41 \times 10^7$
6	10,57	$3,25 \times 10^7$
7	3,52	$1,05 \times 10^8$
8	7,05	$1,22 \times 10^4$
9	5,29	$2,67 \times 10^3$
10	6,17	$2,85 \times 10^7$

Tabela 7. Valores Acidez (D°) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (60 dias após o parto)

Amostra	Acidez ($^{\circ}\text{D}$)	Mesófilos aeróbios/ anaeróbios facultativos (UFC/ml)
1	4,41	$1,67 \times 10^3$
2	3,52	$6,3 \times 10^2$
3	3,52	$2,14 \times 10^5$
4	4,41	$2,8 \times 10^6$
5	3,52	$1,37 \times 10^7$
6	10,57	$5,8 \times 10^7$
7	3,52	$4,45 \times 10^5$
8	7,05	$2,14 \times 10^4$
9	5,29	$1,54 \times 10^6$
10	6,17	$1,06 \times 10^5$

Tabela 8. Valores Acidez (D°) e contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos (UFC/mL) encontrados no leite maduro (90 dias após o parto)

Amostra	Acidez ($^{\circ}\text{D}$)	Mesófilos aeróbios/ anaeróbios facultativos (UFC/ml)
1	3,52	$9,85 \times 10^3$
2	9,93	$2,2 \times 10^4$
3	3,52	$2,38 \times 10^7$
4	4,41	$1,38 \times 10^6$
5	7,05	$8,0 \times 10^5$
6	9,69	$5,67 \times 10^7$
7	5,29	$8,5 \times 10^4$
8	6,17	$1,75 \times 10^5$
9	3,52	$1,39 \times 10^6$
10	3,52	$6,3 \times 10^5$

Nos bancos de leite humano as amostras tituladas que apresentam acidez inferior a 8°D são novamente envasadas para posterior pasteurização e aquelas cuja acidez encontra-se acima de 8°D são descartadas (FIOCRUZ, 2006). Esse procedimento é realizado pelo fato de que uma acidez elevada pode estar relacionada com elevadas contagens de micro-organismos (NOVAK e CORDEIRO, 2007).

De acordo com a FIOCRUZ (2006), das 50 amostras analisadas nesse estudo, 43 (86%) estavam próprias para o consumo ($\leq 8^{\circ}\text{D}$). A maioria dessas amostras apresentaram contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios até 10^6 UFC/mL, porém 4 (9,30%) das 43 amostras com valores de acidez adequados apresentaram contagens acima desse valor como destacado nas Tabelas 6 e 8.

Foram detectadas 7 (14%) amostras ácidas ($>8^{\circ}\text{D}$). Nessas amostras pode-se observar para os micro-organismos mesófilos aeróbios contagens de 10^7 - 10^8 UFC/mL, embora uma amostra tenha apresentado acidez elevada e contagem baixa como destacado na Tabela 8.

De maneira semelhante ao encontrado no presente estudo, Novak e Cordeiro (2007) analisaram 200 amostras de leite humano de doadoras de um banco de leite, com o objetivo de testar a existência da correlação entre a população padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e os valores de acidez em graus dornic. Das 200 amostras analisadas, 192 foram classificadas como aprovadas para consumo (valores de acidez $\leq 8^{\circ}\text{D}$) e apresentaram valores entre $1,0 \times 10^2$ e $6,7 \times 10^5$ UFC/mL de micro-organismos mesófilos aeróbios. As oito amostras impróprias para o consumo (valores de acidez $> 8^{\circ}\text{D}$) apresentaram uma variação da contagem de mesófilos aeróbios entre $8,0 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^7$ UFC/ mL.

Como já mencionado, a literatura relata o desenvolvimento da elevada acidez no leite humano como resultado da produção de ácido láctico a partir da degradação da lactose por micro-organismos presentes, como o observado por algumas amostras avaliadas nesse estudo. Porém, quatro amostras de leite humano coletadas com acidez normal ($\leq 8^{\circ}\text{D}$) apresentaram elevadas contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, e uma amostra que apresentou acidez inadequada ($>8^{\circ}\text{D}$) não apresentou contagem elevada. (Tabelas 6 e 8).

Nesse caso, onde observa-se a ocorrência de uma acidez elevada

porém baixas contagens de micro-organismos, a acidez pode ser oriunda de reações químicas que podem ocorrer no leite humano como observado e proposto por Luzeau et al., (1983) e Cavalcante et al., (2005). Esses pesquisadores relataram que o leite humano fresco ou pasteurizado pode sofrer processos de lipólise com a liberação de ácidos graxos e consequentemente um aumento da acidez dornic. Porém, os dados obtidos no presente estudo não permitiram uma correlação com essa hipótese levantada.

Estudos na área devem ser estimulados, sendo que amostras com valores de acidez elevados podem não estar relacionadas a contaminações elevadas, onde amostras aptas ao consumo podem estar sendo descartadas pelos bancos de leite humano.

5.1.2. pH

Ao analisar o pH das amostras de leite humano, da mesma forma que o observado para a acidez, para os períodos de lactação observa-se que ele não foi diferente significativamente entre si ($p > 0,05$). Ao analisar os resultados para as amostras de leite de diferentes mães conclui-se que existe diferença significativa entre elas com relação ao potencial hidrogeniônico ($p < 0,05$).

Nesse estudo o pH das amostras de leite humano apresentou um pequeno aumento ao longo do período de lactação, porém não significativo. A média do pH das amostras analisadas variou entre 6,35 e 6,94, apresentando-se dentro do proposto pela literatura (CAVALCANTE, 2005).

Foi observado que a média do colostro humano ao apresentar o menor teor de lipídeos (2,6%) comparado aos outros períodos analisados, apresentou também um menor pH (6,35), enquanto o leite maduro (30 dias) com um maior teor de lipídeos (3,7%), apresentou um pH maior (6,55). Isso ocorre pelo fato de que um leite com um menor teor de gordura apresenta um maior teor de sólidos não gordurosos, elevando a acidez do leite humano e diminuindo, portanto seu pH, sendo que quando um maior teor de gordura é verificado o contrário ocorre.

Ao comparar o pH do leite humano com o teor de proteínas pode-se observar que ao mesmo tempo que o conteúdo de proteínas diminui o seu pH aumenta e vice-versa. Essa variação inversa está relacionada da mesma maneira que o discutido anteriormente a diferentes concentrações de sólidos

não gordurosos que levam à alteração da acidez do leite e conseqüentemente à modificação de seu pH. A acidez normal do leite é uma medida da quantidade de álcali que combina com proteínas, citratos, fosfatos e CO₂ presentes no mesmo, sendo que quando a concentração desses compostos é alterada, implica na modificação das características físico-químicas do leite humano como acidez e pH

5.1.3. Proteína

Para a variável proteína, observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães.

A diferença entre os diferentes períodos de lactação segue de acordo com o proposto pela literatura. Segundo Calil et al., 1991, a necessidade de proteínas para o recém-nascido decresce com o período de lactação. Nota-se que os valores encontrados apresentam-se de acordo com o sugerido pelo autor decrescendo ao longo do tempo e atendendo as necessidades dos recém-nascidos.

A variação entre o leite de diferentes mães pode ser oriunda de uma dieta específica a cada lactante, o que faz com que a sua composição com relação ao conteúdo proteico seja alterada.

Comparando o teor de proteínas do leite humano com o leite de vaca, observa-se que esse último possui três vezes mais quantidade de proteína. Isso deve-se ao fato do crescimento do recém-nascido humano ser relativamente mais lento que o crescimento de outros animais. Dessa forma, não se deve introduzir leite de vaca na dieta de lactentes nos seis primeiros meses de vida, sendo que os valores elevados de proteínas encontrados nesse fluido podem causar distúrbios metabólicos, principalmente hepáticos e renais. Além disso, no leite de vaca está presente a β -lactoglobulina, responsável por causar reações alérgicas, não estando presente no leite humano.

5.1.4. Lipídeos

Assim como para o conteúdo de proteína, para a variável gordura, observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães.

Nesse estudo ocorreu conforme o descrito na literatura, onde o conteúdo de lipídeos aumentou ao longo da lactação em até 30 dias após o parto, apresentando média de 2,6% no colostro, 3,6% no leite de transição, 3,7% no leite maduro (30 dias) e diminuindo entre 60 (3,4%) e 90 dias (3,5%).

Dados relativos ao comportamento dos lipídeos no leite humano ao longo da lactação são muito escassos. Além disso, diferenças metodológicas também dificultam a comparação com outros resultados.

De acordo com Lonnerdal (2000) o teor de lipídios no leite humano aumenta conforme a período de lactação. O colostro possui uma menor concentração lipídica, 1,8 a 2,9 g/100mL, e valores intermediários 2,9 a 3,6 g/100mL no leite de transição (CALIL et al., 1991; NASCIMENTO e ISSLER, 2003)

Bitman et al., 1983 verificaram que o conteúdo de lipídeos no leite humano mudou durante a lactação, de um nível mais baixo no colostro para um nível maior, sendo que o leite maduro teve um comportamento relativamente constante ao longo do período. Os resultados apresentados corroboram com os estudos citados.

Harzer et al., (1983) estudando o leite de lactantes alemãs e inglesas, verificaram que o conteúdo de lipídeos do leite humano poderia ser ainda influenciado pela dieta da lactante. Eles observaram que as lactantes alemãs possuíam um hábito de realizar sua principal refeição no período da tarde, onde um maior teor de gordura foi observado. Já as lactantes inglesas tinham uma preferência em realizar sua principal refeição à noite, onde o teor de gordura foi maior.

O teor de lipídeos pode ainda variar ao longo de uma mesma mamada, sendo um possível fator que contribui para maior variabilidade dos resultados ao longo da lactação.

Mais estudos devem ser realizados para comprovar as hipóteses levantadas. Sugere-se para estudos futuros, efetuar pelo menos três coletas durante o dia, uma pela manhã, tarde e noite, verificando-se em cada coleta o horário da última refeição. Isto poderia minimizar as variações que ocorrem no teor de lipídeos do leite humano. Além disso, durante cada coleta, o ideal seria obter uma pequena alíquota do leite do início, meio e fim de cada mamada, obtendo-se dessa forma, uma amostragem mais representativa após cada extração.

5.1.5. Cloretos

Para cloretos também observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães.

De acordo com Callil et al., 1991, níveis elevados de cloreto podem ser encontrados no leite de nutrizas com mastite, com valores maiores naquele proveniente da mama mais afetada. Isso ocorre, pois as junções das células epiteliais são abertas permitindo a passagem de cloretos do plasma para o leite. Essa variável não foi controlada nesse estudo, não podendo fazer correlações do conteúdo de cloreto com a presença de infecções nas mamas.

Dessa forma os resultados obtidos serão relacionados somente com as possíveis alterações ao longo do período de lactação, onde concentrações mais altas de cloretos são características normais da fase de colostro humano decrescendo com o período de lactação (PICCIANO, 2001) como observado nesse estudo.

5.1.6. Umidade

Para a variável umidade não observa-se diferença significativa ($p > 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães.

Poucas variações foram observadas no conteúdo de umidade do leite humano, apresentando sempre uma porcentagem de aproximadamente 87 a 88% como descrito na literatura (NASCIMENTO e ISSLER, 2003).

5.1.7. Cinzas

Para o conteúdo de cloretos não observa-se diferença significativa entre as mães ($p > 0,05$), porém observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação.

Yamawak et al., (2005), concluíram que o leite humano apresenta uma grande variação com relação ao seu conteúdo de minerais sendo afetado esse não somente pelo período de lactação mas também pela nutrição materna.

Essa variabilidade no conteúdo de cinzas entre mães não foi observada no presente estudo e sugere-se que o estado nutricional das lactantes não influenciou na sua composição.

5.2. Microbiologia do leite humano

Os resultados obtidos são as médias dos logaritmos decimais das contagens microbiológicas (UFC/mL) das amostras de leite humano em cada meio utilizado e em cada período de lactação (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto), obtido de 10 mães doadoras.

As contagens médias de *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, anaeróbios, coliformes totais, fungos filamentosos/não filamentosos, mesófilos aeróbios facultativos, em cada período de lactação estão ilustrados na Figura 5.

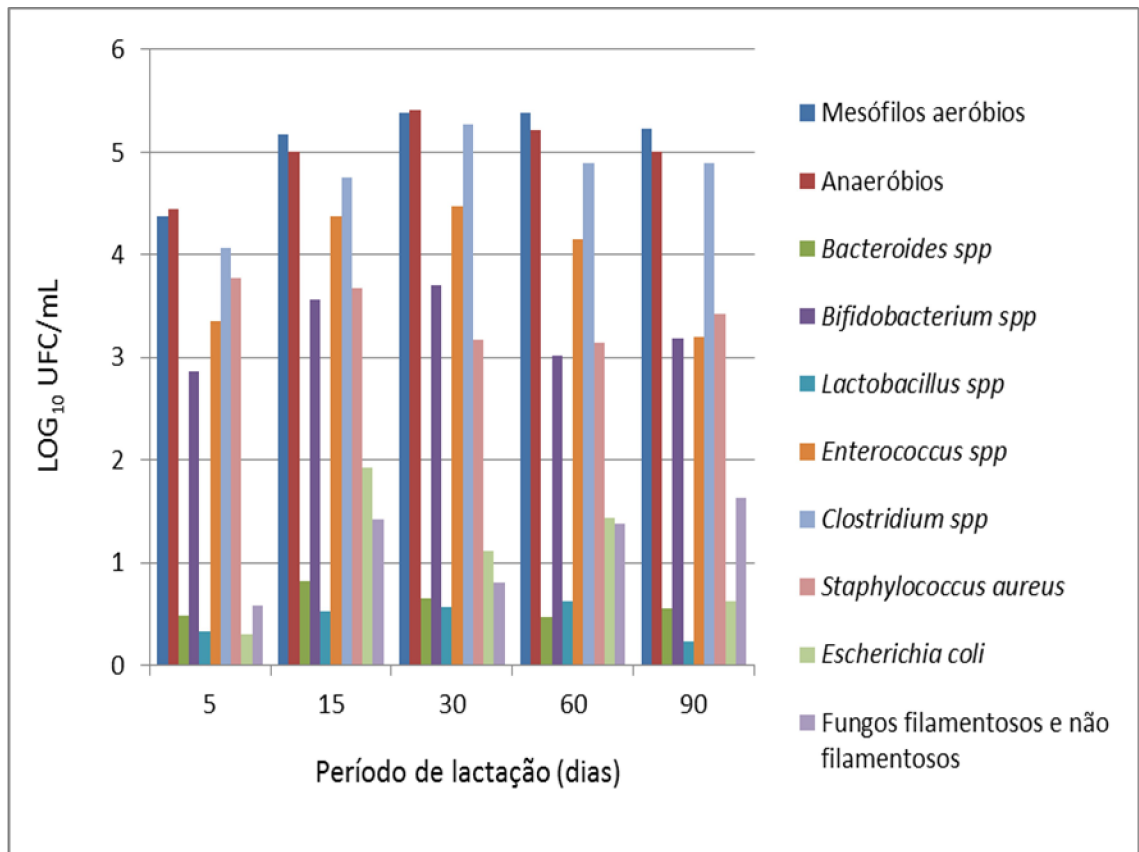


Figura 5. Média do Log₁₀UFC/mL das contagens dos diferentes grupos microbianos em diferentes períodos de lactação.

A tabela 9 apresenta os resultados, expressos em média e desvio padrão das contagens (Log₁₀ UFC/ml) microbiológicas dos grupos pesquisados em cada período de lactação. Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) encontra-se no ANEXO II.

Tabela 9. Média e desvio padrão das contagens microbiológicas (Log_{10} UFC/ml) dos grupos pesquisados em diferentes períodos de lactação

Grupos pesquisados	Período de lactação (dias após o parto)				
	5	15	30	60	90
Mesófilos aeróbios	X*(DP)**	X(DP)	X(DP)	X(DP)	X(DP)
Mesófilos aeróbios	4,38±1,19	5,07±2,11	5,38±2,02	5,39±1,6	5,23±2,15
Anaeróbios	4,45±1,09	5±1,52	5,41±2,06	5,22±1,97	5±1,29
Fungos	0,59±1,11	1,42±1,36	0,8±1,17	1,38±1,3	1,63±1,77
<i>Bifidobacterium</i> spp	2,86±1,44	3,57±1,19	3,71±1,25	3,02±1,49	3,19±1,52
<i>Lactobacillus</i> spp	0,33±0,56	0,53±1,04	0,57±1,21	0,63±1,03	0,77±0,55
<i>Clostridium</i> spp	4,07±1,01	4,75±1,48	5,27±1,93	4,89±1,85	4,89±1,47
<i>Bacteroides</i> spp	0,48±0,66	0,82±1,11	0,65±1,18	0,47±1,05	0,55±0,92
<i>Enterococcus</i> spp	3,36±2,08	4,38±2,39	4,48±2,62	4,15±2,42	3,2±2,23
<i>Escherichia coli</i>	0,3±0,64	1,93±2,12	1,11±1,84	1,43±1,83	0,63±1,32
Coliformes totais	0,4±0,84	2±2,16	1,53±1,98	2,44±2,11	1,3±2,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,78±1,29	3,67±0,91	3,17±1,63	3,14±1,35	3,42±1,33

*média; **desvio padrão;

O gênero *Clostridium* spp esteve presente em todas as amostras avaliadas, seguido por *Staphylococcus aureus* (96%), *Bifidobacterium* spp (94%), *Enterococcus* spp (88%) e fungos filamentosos e não filamentosos (56%). A presença de Coliformes totais (40%), *Bacteroides* spp (34%), *Escherichia coli* (34%) e *Lactobacillus* spp (24%) foi menos frequente. Em geral as contagens foram menores no colostro humano, seguida de um aumento ao longo do período de lactação.

Observa-se um maior pico nas contagens referentes ao colostro humano para o leite de transição sugerindo-se que a presença de uma maior quantidade de bactérias é requerida para a colonização inicial do trato gastrointestinal do recém-nascido nos primeiros dias após o parto.

Ao analisar os resultados para os grupos pesquisados observa-se que para mesófilos aeróbios, anaeróbios, *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de suas contagens entre os períodos de lactação, porém existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite de diferentes mães.

Para os grupos *Bifidobacterium* spp e fungos filamentosos e não filamentosos observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os períodos de lactação e entre as mães.

Já para o grupo coliformes observa-se diferença significativa ($p < 0,05$)

entre os períodos de lactação e as mães.

A diferença entre o leite de mães distintas com relação às contagens e aos diferentes grupos presentes pode ser oriunda da origem dessas bactérias, que no caso está relacionada ao trato gastrintestinal das próprias mães. Diferença qualita e quantitativa dessas bactérias no intestino materno, conseqüentemente resultam na presença de diferentes bactérias no leite humano em concentrações também distintas. Para alguns grupos observa-se que entre os períodos de lactação não há diferença significativa dessas bactérias quando presentes.

A Figura 6 representa a distribuição da frequência da população (UFC/mL) de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nas amostras de leite humano analisadas.

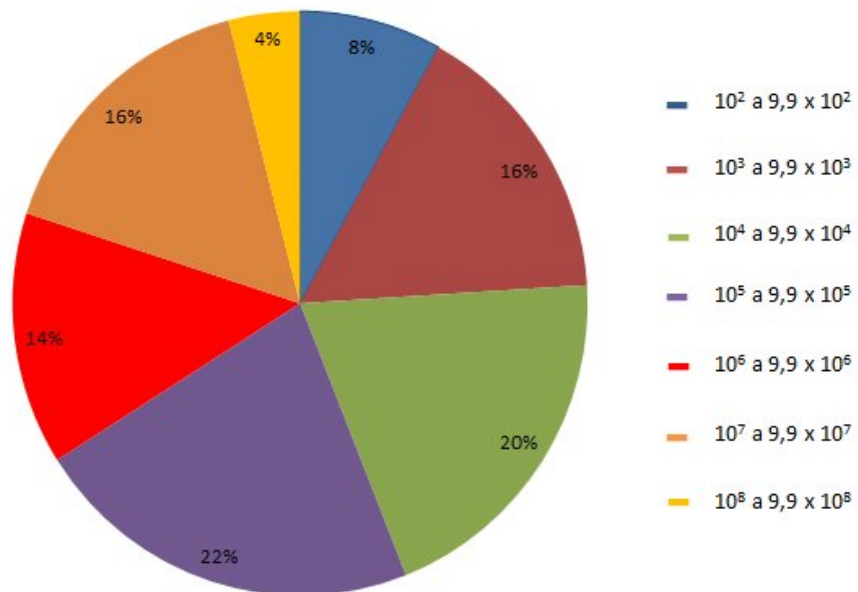


Figura 6. Frequência da população (UFC/mL) de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nas amostras de leite humano analisadas.

A faixa de variação das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nesse estudo ficou entre 10^2 e 10^8 UFC/mL (2 e 8 Log_{10} UFC/mL).

Estudos desenvolvidos por Novak (2007) e Castro (2006) também encontraram faixa de variação semelhante, entre 2 e 7 Log_{10} UFC/mL para micro-organismos mesófilos aeróbios, o que é menor do que o encontrado

nesse estudo, maior do que o encontrado nas pesquisas de Silva e Almeida (2001) e Rodrigues (2005).

A Resolução RDC nº12, de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001) estabelece pela primeira vez no Brasil critérios para controle microbiológico do leite humano, onde a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis permitida é de até 100 UFC/mL.

De acordo com essa Resolução, todas as amostras analisadas no presente estudo estão impróprias para o consumo humano por não apresentarem os parâmetros de acordo com o permitido no Anexo I da referida resolução. Porém essa Resolução é destinada ao leite dos bancos de leite humano, onde os mesmos já passaram pelo o processo de pasteurização e consequentemente devem apresentar contagens baixas de micro-organismos.

De qualquer forma a detecção de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos com contagens acima de 10^5 UFC/mL em 56% das amostras analisadas evidencia elevado grau de contaminação provavelmente devido à ausência das boas práticas de manipulação nas coletas do leite humano. Essa contagem elevada possivelmente está relacionada à presença de contaminantes que ao penetrarem no leite recém-ordenhado encontram condições favoráveis para sua multiplicação. Essa contaminação pode ter sido causada devido à falta de comprometimento das doadoras no momento da coleta das amostras bem como devido a flutuações na temperatura das amostras coletadas até o momento das análises.

Devido à presença de elevadas contagens de micro-organismos contaminantes em amostras de leite humano doadas para bancos de leite humano, torna-se necessário por esses bancos à aplicação de estratégias para eliminar a presença desses contaminantes. O tratamento térmico é uma das opções sugeridas pela OMS e demonstra ser uma estratégia simples e barata (HARTMANN et al., 2006). Embora esse tratamento garanta a qualidade microbiológica do leite humano, causa a perda de componentes nutricionais, imunológicos, além da perda da microbiota natural pertencente ao leite humano.

A população de micro-organismos anaeróbios e anaeróbios facultativos encontrada no leite humano pode incluir uma diversidade de grupos de micro-organismos pesquisados nesse estudo como *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, *Lacobacillus* spp, que serão

discutidos separadamente.

Para o grupo *Enterococcus* spp não foram encontrados estudos relatando a variação das contagens dessas bactérias ao longo da lactação no leite humano afim de comparação, porém alguns autores já identificaram sua presença nesse fluido. Martin et al., (2003) analisaram o leite de oito mães saudáveis coletados quatro dias após o parto, sendo que entre os isolados obtidos e identificados predominou-se duas espécies de bactérias lácticas sendo uma delas *Enterococcus faecium*. Martin et al., (2007) coletaram 10 amostras de leite humano em sete dias após o parto para identificação das principais bactérias predominantes por meio do isolamento do DNA bacteriano das amostras. A maioria das sequências identificadas de bactérias gram-positivas correspondeu a bactérias do ácido láctico sendo detectada a presença de *E.faecalis* e *E.faecium* em duas das dez amostras analisadas. *Enterococcus* spp são bactérias comensais que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de homens e animais (KUHN, et al., 2000). Elas fazem parte do grupo de bactérias do ácido láctico sendo que sua presença e as substâncias por elas produzidas mostram efeitos benéficos no intestino humano. Elas previnem a aderência, estabelecimento e multiplicação de vários patógenos na mucosa entérica por vários mecanismos, lançam diversas enzimas no lúmen intestinal e mostram sinergismo na digestão (NAIDU et al., 1999). Como observado pelo presente estudo, esse grupo de bactérias faz parte da microbiota natural pertencente ao leite humano e não devem ser descritas como contaminantes. Depois de transferidas pela amamentação natural, colonizam o intestino de recém-nascidos apresentando funções específicas na área gastrointestinal.

A presença de *Clostridium* spp foi confirmada em todas as amostras de leite humano analisadas, presente sempre em concentrações elevadas. Não existe na literatura dados sobre a presença desse gênero de micro-organismo no leite humano. Ao contrário, crianças com predominância de *Clostridium* spp em seu trato gastrointestinal são aquelas que são amamentadas com fórmulas infantis e aquelas que pararam de amamentar cedo (SJÖGREN et al., 2009a; SJÖGREN et al., 2009b). O gênero *Clostridium* spp é caracterizado por muitos como sinônimo de infecções (BRAZIER, 2008), entretanto muitas de suas espécies são benéficas ao organismo. *Clostridium sporogenes*, por exemplo, já foi estudado como veículo para terapia contra tumores (MINTON, 2003). Outras

espécies de *Clostridium* spp são responsáveis pela produção de butirato que é responsável por efeitos diversos sobre o cólon como: diminuição da proliferação celular, metabolismo de energia e desenvolvimento normal de células epiteliais do cólon, além de possuir um efeito protetor principalmente em relação ao câncer do cólon (PRYDE, 2002). Dessa forma estudos com relação à presença de diferentes espécies de *Clostridium* spp no leite humano devem ser estimulados, sendo que esses micro-organismos estavam sempre presentes em grandes contagens nas amostras coletadas e em todos os períodos de lactação e devem exercer, portanto, alguma função específica ao serem transferidos de mãe para filho durante a amamentação natural.

O grupo *Bacteroides* spp está presente em apenas 34% das amostras analisadas e em concentrações baixas. Os estudos publicados sobre a bacteriologia de leite humano não fazem referência a esse grupo de micro-organismo. Pesquisas já comprovaram que crianças amamentadas com leite humano apresentam menores proporções desse gênero quando comparados à bifidobactérias e lactobacilos (GUARNER e MALAGELADA, 2003; PENDERS et al., 2006; SJÖGREN et al., 2009a; SJÖGREN et al., 2009b). Este estudo confirma a hipótese acima, uma vez que o leite humano apresenta quando presente, baixas contagens referente a esse grupo microbiano. Apesar de pequenas contagens encontradas no leite humano, *Bacteroides* spp está presente no trato gastrointestinal humano, sendo as espécies encontradas em maiores quantidades no cólon referentes à *B. vulgatus*, *B. distasonis* e *B.thetaiotaomicron* e em menores quantidades referentes à *B. fragilis*, *B.ovatus*, *B. eggerthii* e *B. uniformis*, sendo que ambas desempenham funções específicas e essenciais no ecossistema do cólon (SALYERS, 1984). Essas bactérias parecem manter uma relação complexa e geralmente benéfica com o hospedeiro quando retido no intestino, embora muitas estirpes estejam relacionadas à patogenicidade. Avanços na área de genômica e proteômica têm possibilitado uma maior compreensão da maneira pela qual as espécies de *Bacteroides* se adaptam e prosperam no intestino humano. Alguns exemplos são (i) sistemas complexos de sentir e adaptar-se a disponibilidade de nutrientes, (ii) sistemas de bombas múltiplas para expulsar substâncias tóxicas, e (iii) capacidade de influenciar o sistema imune do hospedeiro para o controle de patógenos (WEXLER, 2007). Além disso, essas bactérias ao colonizarem o trato gastrointestinal utilizam carboidratos como polissacarídeos, resultando na

produção de um conjunto diverso de ácidos graxos voláteis que são absorvidos através do intestino grosso e utilizados pelo hospedeiro como uma fonte de energia (HOOPER, et al., 2002). Algumas espécies também podem exercer ação simbiótica com outras bactérias. *Bacterioide thetaiotaomicron*, uma espécie estudada recentemente e relacionada a diversas funções benéficas no trato gastrintestinal, pode quebrar uma grande variedade de ligações glicosídicas fornecendo nutrientes para utilização por *Bifidobacterium longum*. (SONNERNBURG et al., 2005).

Staphylococcus aureus é encontrado na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40% na boca e 10 a 35% na saliva (HERCEG e PETERSON, 1990). A maior preocupação quanto à sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização (ALMEIDA et al., 1998). Das amostras avaliadas 96% confirmaram a presença de *S.aureus*. Outros estudiosos avaliaram a presença dessa bactéria em leite humano recém-ordenhado. Carroll et al (1979) detectaram a presença de *S. aureus* em 13 (6,2%) amostras das 207 pesquisadas. De 7.570 amostras de leite humano, Colaço et al., (2001), detectaram em 40% destas, a confirmação de *S. aureus*. Serafini et al., (2003) analisaram 194 amostras de leite humano cru e observaram a presença dessa mesma bactéria em 7,35% das amostras coletadas. De forma semelhante ao presente estudo Pereira *et al.*, (1995) relatou a presença de *S.aureus* em todas as amostras de leite humano analisadas (n = 19). As diferenças observadas entre estes resultados podem estar associadas às metodologias empregadas para coleta e armazenamento das amostras de LH, assim como, às técnicas empregadas para cultivo, isolamento e identificação deste microrganismo. Segundo autores que analisaram amostra de leite humano cru, a presença dessa bactéria pode ser oriunda da contaminação secundária a partir da pele, fossas nasais e boca; da utilização de mãos e/ou utensílios em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante coleta do leite; ou ainda, segundo Pereira et al., (1995), resultado de mamas com mastite. Porém, algumas estirpes podem ser provenientes da microbiota natural presente no leite, e, apesar dessa bactéria estar geralmente relacionada patogenicidade, ao colonizarem o trato gastrintestinal dos recém-nascidos após amamentação, estarão realizando somente um papel na ecologia microbiana nessa área, sem causar danos na saúde do hospedeiro.

O grupo de coliformes inclui bactérias bacilos aeróbios ou anaeróbios facultativos, gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, incluindo vários gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae, sendo seu habitat natural o trato intestinal do homem com potencial variado de patogenicidade (SPECK, 1984). Almeida (1986) encontrou contagens superiores ao presente estudo, de até 4,0 (Log₁₀UFC/mL), em leite recém-ordenhado. LIN *et al.* (1988) encontraram valores inferiores a 1,0 (Log₁₀ UFC/mL). A presença de coliformes totais foi confirmada em 40% das amostras analisadas. Ramos (2006) obteve contaminação por coliformes em todas as amostras de leite humano cru coletadas e Castro (2006) em 75%. Serafini *et al.*, (2003) detectaram a presença de coliformes em 22,1% das amostras de leite humano cru analisadas. Novak e Almeida (2002) verificaram que de 343 amostras de leite humano cru recém-ordenhado a partir da coleta domiciliar, 31,2% mostraram positividade para o grupo coliformes, semelhante ao encontrado nesse estudo.

Com relação à *Escherichia coli*, a maioria das amostras de leite humano apresentaram contagens < 1UFC/mL, porém a presença dessa bactéria em 34% das amostras analisadas é um fato que merece destaque uma vez que sua presença é utilizada como um indicador clássico de contaminação fecal estando associada, com certa probabilidade, a existência de bactérias patogênicas normalmente mais difíceis de serem detectadas, sugerindo a ocorrência de falhas na manipulação do leite pelas doadoras em alguns casos (LEYVA *et al.*, 1991).

Geralmente, estudos relacionados à microbiologia de leite humano relacionam a presença desses dois grupos discutidos anteriormente como más condições higiênico-sanitárias antes e durante a coleta das amostras, indicando que as mesmas entraram em contato de forma direta ou indireta, com material de origem fecal, sugerindo-se maiores precauções antes e no momento das coletas do leite humano.

Durante a coleta das amostras nesse estudo foram tomadas todas as medidas necessárias para evitar esse tipo de contaminação, embora não se descarte a possibilidade de ocorrência. Porém, acredita-se que a presença dessas bactérias quando em contagens reduzidas são oriundas do próprio leite humano, e da mesma forma como o discutido para *S.aureus*, sua presença está relacionada à posterior colonização do trato gastrintestinal, tratando-se de

estirpes que não causariam danos na saúde do recém-nascido ao colonizarem essa área. Entretanto quando em contagens elevadas essas podem ser oriundas de contaminação externa.

Nesse estudo foi identificada a presença de fungos filamentosos e não filamentosos em 56% das amostras analisadas. Serafini et al., (2003) analisaram 194 amostras de leite humano cru e observaram a presença de fungos filamentosos e não filamentosos em 31,6%. Colaço et al., (2001), detectaram contaminação menor, com positividade em apenas 6,5% das 230 amostras coletadas.

Nesse caso, sugere-se que as condições higiênico-sanitárias no momento da coleta não foram àquelas preconizada em todos os momentos durante esse estudo. Os dados obtidos demonstraram a importância do controle da assepsia das mãos e mamilos das doadoras que estejam manipulando imediatamente antes da coleta do leite, pois os fungos contidos no ambiente podem ser transferidos para as mãos das doadoras e consequentemente para o leite humano coletado.

Embora *Lactobacillus* spp refira-se a um grupo de bactéria mais frequentemente isolada do leite humano do que *Bifidobacterium* spp, observa-se com os resultados que sua presença foi menos frequente, sendo que menores contagens também foram encontradas. Se de fato ambos os grupos colonizam o trato gastrointestinal de recém-nascidos após amamentação, os resultados corroboram a hipótese acima, pois lactobacilos estão sempre em uma menor proporção no trato gastrointestinal quando comparadas com as bifidobactérias.

Bifidobacterium spp e *Lactobacillus* spp são os principais gêneros de bactérias conhecidas como probióticos e devem ser consideradas como bactérias pertencentes à microbiota endógena do leite humano. Possuem estirpes produtoras de ácido láctico, fazendo parte de alimentos funcionais como alguns leites fermentados (SNELLING, 2005).

O estabelecimento inicial de BAL no trato gastrointestinal de recém-nascidos e o papel do leite humano como fonte dessas bactérias ainda não é bem compreendido. Não existe na literatura estudos com relação às contagens desses gêneros de bactérias ao longo do período de lactação no leite humano. Entretanto algumas estirpes já foram isoladas do mesmo.

As espécies do gênero *Lactobacillus* spp isoladas de leite humano até o

momento são *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. salivarius* (HEIKKILA e SARIS, 2003; MARTIN et al., 2003). Várias dessas estirpes (derivados de outras fontes que não o leite humano) têm demonstrado propriedades imunomoduladoras (LOMAX e CALDER, 2009). Jara et al., (2011), obtiveram 98 isolados obtidos de 48 amostras de leite humano coletadas de 6 a 11 dias após o parto, sendo que entre as estirpes isoladas as mais predominantes foram: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. salivarius* respectivamente. Apesar dessas evidências, ainda há pouca informação com relação à presença e variação de *Lactobacillus* spp no leite humano bem como a respeito de seus mecanismos de ação no neonato.

Com relação ao gênero *Bifidobacterium* spp, menores informações são encontradas até momento com relação a sua presença no leite humano, e poucas estirpes foram isoladas desse fluido. Estirpes de *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve* foram isoladas de leite humano obtido de 5 mães doadoras saudáveis, sendo as amostras coletas e analisados em 5 períodos, sendo eles: 1 dia, 1 mês e 3 meses após o parto. (SOLÍS et al., 2010). Zacarias et al., (2011) isolaram 4 cepas de *Bifidobacterium animalis* de 16 amostras de leite humano coletadas entre 1 a 12 dias após o parto.

Ambos os dois grupos pesquisados e discutidos anteriormente possuem diversas funções específicas no organismo humano, sendo uma delas o desenvolvimento e a maturação do sistema imune e produção de substâncias antimicrobianas que agem sobre uma vasta gama de micro-organismos patogênicos tornando o ambiente desfavorável ao seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, previnem a adesão de patógenos através da competição por sítios receptores; atuam na manutenção da barreira da mucosa intestinal; atuam na produção de anticorpos (IgA intestinal e sérica); reduzem a produção intestinal de citocinas pró-inflamatórias; aumentam a produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias (PASCHOAL. et al., 2010).

Portanto a confirmação desses gêneros de bactérias no leite humano, com possível potencial probiótico, mostra a importância do aleitamento materno como fonte de micro-organismos probióticos, que depois de transmitidos ao recém-nascido durante a amamentação natural irão exercer seus efeitos benéficos no trato gastrointestinal.

5.3. Biodiversidade microbiana – Coloração de Gram

A partir da coloração de Gram realizada nas amostras de leite humano, observou-se uma diversidade muito grande de micro-organismos em todos os períodos de lactação. Os resultados obtidos mostram um predomínio de bactérias gram-positivas.

A presença de morfologias diversas como cocos, diplococos, sarcinas, estreptococos, estafilococos, bacilos, bacilos em cadeia, indica uma microbiota variada, confirmada pelos resultados obtidos nos plaqueamentos em meios específicos e pela coloração de Gram realizada nos isolados obtidos.

5.4. Isolados obtidos

As Tabelas 10 e 11 apresentam o número de isolados obtidos a partir do meio MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) e Rogosa (*Lactobacillus* spp) de cada amostra de leite humano coletada e em cada período de lactação analisado.

Tabela 10. Número de Isolados obtidos do meio MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) em cada amostra analisada

Amostra	Período de lactação					Total
	5	15	30	60	90	
1	5	5	5	5	5	25
2	5	5	5	5	5	25
3	5	5	5	5	5	25
4	5	5	5	5	5	25
5	5	5	5	5	5	25
6	0	5	5	5	5	20
7	5	5	5	5	5	25
8	5	5	5	5	5	25
9	5	5	5	0	0	15
10	5	5	5	5	5	25
Total	45	50	50	45	45	235

Tabela 11. Número de isolados obtidos do meio Rogosa (*Lactobacillus* spp) em cada amostra analisada

Amostra	Período de lactação					Total
	5	15	30	60	90	
1	5	5	5	5	5	25
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	5	0	5
4	0	0	0	0	0	0
5	0	5	5	5	0	15
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	5	0	0	0	0	5
9	0	0	0	0	0	0
10	5	5	0	0	0	10
Total	15	15	10	15	5	60

5.5. Atividade hemolítica

Para avaliar a ausência da produção de hemolisina, característica desejável de bactérias probióticas, foi realizado o teste da atividade hemolítica nos isolados obtidos dos meios Rogosa (*Lactobacillus* spp) e MRS modificado (*Bifidobacterium* spp).

A reação hemolítica foi verificada pela formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), pela formação de pigmento verde ao redor da colônia (α - hemólise) e pela ausência de reação (γ - hemólise).

Dentre os 60 isolados de *Lactobacillus* spp, constatou-se atividade β – hemolítica em 5 (8,33%) e α – hemolítica em 5 (8,33%), como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12. Atividade hemolítica dos isolados obtidos do meio Rogosa (*Lactobacillus* spp) de cada amostra de leite humano coletada

Amostra/ período de lactação	Atividade hemolítica dos isolados (número de isolados positivos para cada reação)		
	α – hemólise	β – hemólise	γ – hemólise
1* T5**	0	0	5
1 T15	0	0	5
1 T30	0	0	5
1 T60	0	0	5

1 T90	0	0	5
3 T60	0	0	5
5 T15	0	0	5
5 T30	0	0	5
5 T60	0	5	0
8 T5	0	0	5
10 T5	0	0	5
10 T15	5	0	0
Total	5	5	50

*amostra; **período de lactação.

Dentre os 235 isolados de *Bifidobacterium* spp, constatou-se atividade β – hemolítica em 10 (4,25%) como mostrado na Tabela 13.

Tabela 13. Atividade hemolítica dos isolados obtidos do meio MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) de cada amostra de leite humano coletada

Amostra/período de lactação	Atividade hemolítica (número de isolados positivos para cada reação)		
	α – hemólise	β – hemólise	γ – hemólise
1* T5**	0	0	5
1 T15	0	0	5
1 T30	0	0	5
1 T60	0	0	5
1 T90	0	0	5
2 T5	0	0	5
2 T15	0	0	5
2 T30	0	0	5
2 T60	0	0	5
2 T90	0	0	5
3 T5	0	0	5
3 T15	0	0	5
3 T30	0	0	5
3 T60	0	0	5
3 T90	0	0	5
4 T5	0	0	5
4 T15	0	0	5
4 T30	0	0	5
4 T60	0	0	5
4 T90	0	0	5
5 T5	0	0	5
5 T15	0	0	5

5 T30	0	0	5
5 T60	0	5	0
5 T90	0	0	5
6 T15	0	0	5
6 T30	0	0	5
6 T60	0	0	5
6 T90	0	0	5
7 T5	0	0	5
7 T15	0	0	5
7 T30	0	0	5
7 T60	0	0	5
7 T90	0	0	5
8 T5	0	0	5
8 T15	0	0	5
8 T30	0	0	5
8 T60	0	0	5
8 T90	0	0	5
9 T5	0	0	5
9 T15	0	0	5
9 T30	0	0	5
10 T5	0	0	5
10 T15	0	5	0
10 T30	0	0	5
10 T60	0	0	5
10 T90	0	0	5
Total	0	10	225

*amostra; **período de lactação.

Podemos observar com as tabelas apresentadas que uma porcentagem pequena dos isolados obtidos dos dois meios apresentou reação positiva (β -hemólise ou α -hemólise).

A produção de hemolisina é um fator de virulência comum entre vários micro-organismos patogênicos que facilita a disponibilidade de ferro utilizado durante seu metabolismo, e causa anemia e edema no hospedeiro (VERTERLUND et al., 2007).

Bactérias do ácido láctico por serem micro-organismos fastidiosos, apresentam um grande requerimento nutricional e normalmente os meios de crescimento incluem ferro e/ou manganês. Espécies de lactobacilos são capazes de multiplicar em meios com ausência de ferro, apresentando uma exigência absoluta de manganês para o seu crescimento ótimo (IMBERT e

BLONDEU, 1998).

No entanto, na literatura têm sido relatados casos de estirpes de *Lactobacillus* spp produtores de hemolisina, como observado neste estudo (Tabela 8). Baumgartner et al., (1998), constataram atividade α -hemolítica em sangue de carneiro para as 53 estirpes de *L. rhamnosus*. Similarmente, Maragkoudakis et al., (2006), verificou que das 29 estirpes de *Lactobacillus* spp de origem láctea, 4 apresentaram atividade α -hemolítica em sangue humano.

A atividade hemolítica constatada em alguns dos isolados analisadas evidência que estudos desta natureza devem ser efetivados para bactérias do gênero *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp, mesmo sabendo que esse mineral não é essencial para o seu crescimento e que tal fator de virulência compromete o seu caráter probiótico pelos danos que poderiam causar a saúde do hospedeiro.

Os isolados que apresentaram atividade γ -hemolítica, ou seja, ausência da enzima seriam os mais indicados para o prosseguimento do estudo sobre o potencial de seu uso como probiótico, podendo assim ser adicionados ao leite depositados nos bancos de leite humano após o processo de pasteurização.

Ramos (2006) concluiu que a adição de bactérias probióticas em leite humano pasteurizado alterou benéficamente a microbiota intestinal de animais diminuindo a concentração de bactérias do grupo coliformes. Portanto, os isolados obtidos nesse estudo a partir dos meios Rogosa (*Lactobacillus* spp) e MRS modificado (*Bifidobacterium* spp) que apresentaram ausência da produção de hemolisina, após identificados e avaliadas quanto a outras características de segurança, a ausência de virulência e outras características probióticas, poderão ser adicionadas ao leite dos bancos de leite humano, tendo potencial para atuar benéficamente melhorando o perfil microbiológico intestinal de crianças que tenham a necessidade de usá-lo.

6. CONCLUSÕES

A caracterização microbiológica e físico-química do leite humano em seus diferentes períodos de lactação mostra um fator importante no gerenciamento dos bancos de leite humano, uma vez que o recém-nascido poderá receber o leite com as mesmas características específicas do período em que se encontra.

De maneira geral as maiores variações foram observadas entre leites de diferentes mães, sendo que entre os períodos de lactação menores variações foram detectadas com relação às análises microbiológicas.

A possibilidade de o leite humano ser um fator importante na colonização inicial da microbiota intestinal neonatal foi corroborada com os resultados deste estudo, onde foi obtida a confirmação de diferentes grupos de bactérias presentes no leite humano em seus diferentes períodos de lactação incluindo *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus aureus* que devem ser considerados como componentes da microbiota natural do leite humano, e não como bactérias contaminantes, estando diretamente relacionados com a colonização do trato gastrintestinal do recém-nascido. Além disso, alguns dos isolados obtidos dos meios específicos para *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp, possuem características que apresentam potencial para serem usados como probióticos.

Por isso a identificação a nível genético dos isolados obtidos torna-se importante, uma vez que não houve diferença significativa entre os períodos de lactação, mas entre os gêneros encontradas nas diferentes amostras. Os isolados de interesse obtidos nesse estudo após identificados geneticamente quanto a espécie e avaliados quanto a ausência de fatores de virulência poderão ser selecionados e adicionados ao leite depositado nos bancos de

leite humano após o processo de pasteurização, carreando ao recém-nascido desprovido do leite de sua mãe a microbiota específica do período em que se encontra.

A presença de uma microbiota contaminante é resultado de um controle inadequado das condições higiênico-sanitárias antes e durante a coleta das amostras. A contaminação pode ser proveniente tanto do ambiente de coleta quanto das mãos e mamas das doadoras.

A presença de uma microbiota diversificada no leite humano implica no fato de que a microbiota intestinal das mães possa ter um efeito direto sobre a saúde dos lactantes. Ainda é debatida a origem dessas bactérias presentes no leite humano. Para estudos futuros sugere-se a verificação da hipótese da existência de um fluxo de micro-organismos a partir do intestino de mulheres que amamentam para as glândulas mamárias. Embora tal hipótese seja ainda controversa, espera-se que a confirmação nesse estudo sobre a presença de uma microbiota diversa no leite humano ao longo do período de lactação possa estimular a investigação nesta área fascinante. Modernas técnicas de biologia molecular em estudos de ecologia microbiana podem facilitar o estudo dessas relações complexas entre diferentes ecossistemas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGET. Trace elements of micropremie. **Clinics in Perinatology**, n. 27, p. 119 – 129, 2000.

AKRÉ, J. **Alimentação infantil: bases fisiológicas**. Panamá: Instituto de Nutrição do Centro da América e Panamá, 1990. p. 19-53.

AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S. Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers. **Nutrition**, v. 6, n. 11-12, p. 1069-1073, 2000.

ALMEIDA, J. A. G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite**. Viçosa, MG: UFV, 1986. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1986.

ALMEIDA, J. A.; NOVAK, F. R. **O leite humano: qualidade e controle**. In: Curso de Extensão. X Congresso Brasileiro de Mastologia, p. 35 – 52, 1995.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, I. S. **Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano ordenhado**. In: / *Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano*; 8-12 de julho de 1998. Brasília (DF), p. 10, 1998.

ALMEIDA, J.A.G., GUIMARÃES, V.; NOVAK, F.R. **Normas técnicas redeblh-br para bancos de leite humano: seleção e classificação do leite ordenhado cru**. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br>. Fevereiro de 2005. Acesso em 03 de março de 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th Ed. APHA, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for the examination of dairy products**, 17th ed. APHA, 2004.

ANDERSON, G. H. Human milk feeding. **Pediatric Clinics of North America**, v. 32(2), p. 335 – 353, 1985.

ANDERSSON, Y.; SAVMAN, K.; BLACKBERG, L.; HERNELL, O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. **Acta Paediatrica**, v. 96, p. 1445 - 1449, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano**. Diário Oficial da União, Brasília, 5 set. 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 01 de fevereiro de 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília, 2008. 159 p.

ARAÚJO, R. S. R. M. **Determinação dos tipos e teores de aminos bioativas no leite humano em diferentes fases de lactação e o efeito do processamento**. Belo Horizonte: Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG. 2003. 78 p. (Trabalho de Pós-Doutorado em Ciência de Alimentos).

ASSOCIATION OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 18th ed., AOAC, Washington, 1998.

ATKINSON, S. A; BRYAN, M .H; ANDERSON, G. H. Human milk feeding in premature infants: protein, fat and carbohydrate balance in the first two weeks of life. **Journal of Pediatrics**, v. 99, p. 617 – 624, 1981.

BARROS, M. D; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Milk composition of low birthweight infants mothers. **Acta Paediatrica**, v. 73, p. 693 – 694, 1984.

BAUMGARTNER, A., KUEFFER, M., SIMMEN, A.; GRAND, M. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and Technology. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 31, p. 489 – 494, 1998.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.

42, n. 1, p. 2 – 7, 1998.

BEZKOROVAINY, A. Human milk and colostrum proteins: a review. **Journal. Dairy Science**, v.19, p.1023-1037, 1977.

BITMAN, J.; WOOD, D. L.; HAMOSH, M., HAMOSH, P.; MEHTA, N. R. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 38, p. 300 – 312, 1983.

BLAUT, M. Relationship of probiotics and food to intestinal microflora. **Europea Journal of Nutrition**, v. 41, p. 11 – 16, 2002.

BORGIO, L. A.; RAMOS, K. L.; ALMEIDA, S. G. de A.; SEIDE, L. O.; OLIVEIRA, L. A. de; ARAÚJO, W. M. C. Avaliação do funcionamento e identificação de pontos críticos de controle, em bancos de leite humano do Distrito Federal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 43-46, 2005.

BRAGA, L. P. M.; PALHARES, D. B. Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 59-63, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Como ajudar as mães a amamentar**. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 4. ed. Brasília, 2001a. 48 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de 2 anos**. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 set. 2006.

BRUZZESE, E; VOLPICELLI, M; SQUAGLIA, M; TARTAGLIONE, A; GUARINO, A. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n. 2, p. 283 – 287, 2006.

CALIL, V. M. L. T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. **Composição nutricional do colostro de mães de recém nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional e nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação, vantagens em relação ao leite de vaca.** Disponível em <http://www.pediatriaopaulo.usp.br/upload/pdf/83.pdf>. Abril de 1991. Acesso em: 05 jan. 2011.

CAMARGO, I. L. B. C. **Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp. isolados no Brasil.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2005. 153p.

CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO; M. M. S. Composição do leite humano, aspectos imunológicos. In: REGO, J.D. (Ed) **Aleitamento Materno.** São Paulo: Atheneu, 2006. p.103-120.

CARROLL, L.; DAVIES, D. P.; OSMAN, M.; MCNEISH, A. Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. **Lancet**, v. 2, p. 732 – 733, 1979.

CARVALHO, M. R.; PAMPLONA, V. Pós-parto e amamentação: dicas e anotações. São Paulo: **Agora**, 2001.

CASEY, C. E.; NEIFERT, M. R; SEACAT, J. M; NEVILLE, M. C. Nutrient intake by breastfed infants during the first five days after birth. **American Journal of Diseases of Children**, v. 140, n. 9, p. 933-936, 1986.

CASTRO, M. R. C. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em Banco de leite humano.** 2006. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos). – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

CAVALCANTE, J. L. P.; TELLES, F. J. S.; PEIXOTO, M. M. L. V.; RODRIGUES, R. C. B. Uso da acide titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 103 – 108, 2005.

COLAÇO, W.; SERVA, V. B.; LIRA, C. S. **Perfil microbiológico do leite humano ordenhado, distribuído no banco de leite humano do IMIP, no período de julho/95 a dezembro/ 99.** In: *XII Encontro Nacional de Analista de Alimentos*; 04 a 08 de novembro de 2001. Maceió; 2001. p. 213.

COPPA G. V; BRUNI, S.; MORELLI, L.; SOLDI, S.; GABRIELLI, O. The first probiotic in humans: human milk oligosaccharides. **Journal of Clinical**

Gastroenterology, v. 38, p. 80 – 83, 2004.

CORRÍA, V. D. A. R. Lactancia materna: evaluación nutricional en el recién nacido. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 77, n. 2, p. 1 – 10, 2005.

COSTA, R. S. S.; CARMO, M. G. T.; SAUNDERS, C.; JESUS, E. F. O.; LOPES, R. T.; SIMABUCO, S. M. Characterization of iron, copper and zinc levels in the colostrum of mothers of term and pre-term infants before and after pasteurization. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 114 – 117, 2003.

Cunha, L. R. **Parâmetros de segurança de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos, com indicação de uso como probiótico em bancos de leite humano**. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; 2006. 117p.

ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R. AND MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 695-703, 2000.

EUCLYDES M. P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. Viçosa: UFV, 2000, 488p.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação saudável**. Viçosa: 3^a ed. Viçosa, 2005. 548p.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 39 – 49, 2002.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Normas técnicas Rede BHL-Br para bancos de leite humano**. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/doadora.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2012.

GERMAN, J. B; DILLARD, C. J; WARD, R. E. Bioactive components in milk. **Current Opinion in Clinical and Nutrition Metabolic**, v.5, n. 6, p. 653-658, 2002.

GRIFFIN I.J., DAVILA, P.M. AND ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes, **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 187 – 191, 2002.

GROSS, S. J.; GELLER, J.; TOMARELLI, R. M. Composition of breast milk from mothers of preterm infants. **Pediatrics**, v. 68, p. 490 – 493, 1981.

GUARNER, F. El colon como órgano: hábitat de flora bacteriana. **Nutrición Hospitalaria**, p. 2 – 7, 2002.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet** , v. 361, p. 512 – 519, 2003.

GUEIMONDE, M; LAITINEN, K; SALMINEN, S; ISOLAURI, E. Breast milk: A source of Bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, p. 64 – 66, 2007.

HAMILTON-MILLER, J.M.T., GIBSON, G.R. AND BRUCK, W. Some insight into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. **British Journal of Nutrition**, v. 90, 840 – 845, 2003.

HARTMANN, S. U.; BERLIN, C. M.; HOWETT, M. K. Alternative modified infant-feeding practices to prevent postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast milk: past, present, and future. **Journal of Human Lactation**, v. 22, n. 1, p. 75 – 88, 2006.

HARZER, G.; HAUG, M.; DIETERICH, I.; GENTNER, P. R. Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 37, p. 612 – 621, 1983.

HECK, A. R.; **Controle de qualidade: da coleta à distribuição**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCO DE LEITE HUMANO, Ribeirão Preto, 2002.

HEIKKILA, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 471 – 478, 2003.

HERCEG, R. J.; PETERSON, L. R. **Normal flora in health and disease**. In: Mandell, Douglas, Bennilt, editors. Principles and practice of infectious disease. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; p. 6 – 14, 1990.

HOLDEMAN L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. **Anaerobe Laboratory Manual**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 1987, 167p.

HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 283 – 307, 2002.

HUSAIN, S. Effect of Ferric Iron on Siderophore Production and Pyrene Degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v. 57, p. 331 – 334, 2008.

IMBERT, M.; BLONDEAU, R. On the iron requirement of *Lactobacilli* grow in chemically defined medium. **Current Microbiology**, v. 37, p. 64-66, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ; **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 4ªed., São Paulo, 2008.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice e Research Clincial Gastroenterology**, v.18, p. 299 – 313, 2004.

JALDIN, M. G. M.; SANTANA, R. B. **Anatomia da mama e fisiologia da lactação**. In: REGO, J.D. São Paulo: (Ed) Aleitamento Materno, Atheneu, p. 41 – 54, 2006.

JARA, S.; SÁNCHEZ, M.; VERA, R.; COFRÉ, J.; CASTRO, E. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. **Clinical Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 474 – 477, 2011.

KALLIOMAKI, M.; KIRJAVAINEN, P.; EEROLA, E.; KERO, P.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 107, p. 129 – 134, 2001.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. Composição do leite humano – fatores nutricionais. **Aleitamento Materno**, São Paulo, Atheneu, p. 47 – 58, 2001.

LEVRI, K.M., KETVERTIS, K., DERAMO, M., MERENSTEIN, J.H. AND D'AMICO, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. **Journal of Family Practice**, v. 54, p. 613 – 620, 2005.

LEYVA, C. V.; VALDOS, A. E.; CISNEROS, D. E. e RIVERO, L. L. Biochemical characterization of fecal coliform strains isolated from food. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, v. 5, p. 118 – 121, 1991

LIN, F. J.; BARNHART, H. M.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; EITENMILLER, M. Bacteriological profiles of human milk from individual donors and pooled samples from a commercial milk bank. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 467 – 470, 1988.

LOMAX, A. R.; CALDER, P. C. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted humans. **Currente Pharmaceutical**, v. 15, p. 1428 – 1518, 2009.

LÖNNERDAL, B. Biochemistry and physiologic function of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.42, p.1299-1317, 1985.

LÖNNERDAL, B. Breast milk: a truly functional food. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 5100-5111, 2000.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537S – 1543S, 2003.

LUZEAU, R.; BARROIS, V.; ODIEVRE, M. Acide gras non estérifiés et acidité titrable du lait maternel. **Archives Francaises de Pediatrie**, v. 40, p. 449 – 451, 1983.

MAN, J. D., ROGOSA, M. A.; SHARPE, M. A. Medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130 – 135, 1960.

MARAGKOUidakis, P. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 189–199, 2006.

MARTIN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMENEZ, E.; MARIN, M. L.; XAUS, J.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J. M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Jornal Pediatria**, v. 143, p. 754 – 758, 2003.

MARTIN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; OLIVARES, M.; BOZA, J.; JIMÉNEZ, J.; FERNÁNDEZ, L.; XAUS, J.; RODRÍGUES, J. M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science e Technology**, v. 15, p. 121 – 127, 2004.

MARTIN, R.; HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; SMIDT, H.; RODRÍGUES, J. M. Cultivation-independent

assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 31 – 37, 2007

MARTINS, A. R; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Journal of Food and Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATHER, I. H.; KEENAN, T. W. Origin and Secretion of Milk Lipids. **Journal of Mammary Gland BioLogY and Neoplasia**, v. 3, n. 3, p. 259 – 273, 1998.

MCMANAMAN, J. L.; NEVILLE, M. C; Mammary physioLogY and milk secretion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 629 – 641, 2003.

MELO, S. L. **Amamentação: contínuo aprendizado**. Belo Horizonte: Coopmed, 2005.

MILLER-CATCHPOLE, R., KOT, E., HALOFTIS, G., FURMANOV, S., BEZKOROVAINY, A. V. Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. **Nutrition. Research**, v. 17, n. 2, p. 205-213, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manejo e promoção do aleitamento materno**, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília (DF); 10 de janeiro de 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, RNBLH – **Regulamento técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano**, Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, 2006.

MINTON, N. P. Clostridium cancer therapy. **Nature. Reviews Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 237 – 242, 2003.

MISLIVEC, P. B.; BEUCHAT, L. R.; COUSIN, M. A. **Yeasts and molds**. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington (DC): American Public Health Association, p. 239 – 249, 1992.

MORGANO, M. A.; NETO, J. M.; RONDÓ, P. H. C.; SOUZA, L. A. Composição mineral do leite humano de bancos de leite. **Ciência e Tecnologia de**

Alimentos, Campinas, v. 25(4), p. 819-824, out.-dez. 2005.

MOURA, E. C. Nutrição: composição do leite humano na gestação a termo e pré-termo. **Amamentação: bases científicas para a prática profissional**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 60 – 87, 2002.

MUSSO, G; GAMBINO, R; CASSADER, M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. **Current opinion in lipidology**, v. 21, n. 1, p. 76 – 83, 2010.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 113 – 126, 1999.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: marking the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas**, São Paulo, v. 58, n.1, p.49-60. 2003.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; VIEIRA, G. O; BORBA, L. M. Colostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 4, p. 265 – 270, 2001.

NOVAK, F. R; ALMEIDA, J. A. G de; SANTOS, M. J. S and WANKE, B. Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro [online], v. 78, n. 3, p. 197 – 201, 2002.

NOVAK, F. R., CORDEIRO, D. M. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. **Journal of Pediatric**, Rio de Janeiro, v.83, n.1, p.87-91, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The optimal duration of exclusive breastfeeding**. Geneva: World Health Organization, 2008.

PASCHOAL, V.; NAVES, A.; FONSECA, A. **Nutrição Clínica Funcional: Dos princípios à prática Clínica**. 1a Ed. revisada. São Paulo: VP editora; 2010

PENDERS, J; THIJIS, C; VINK, C; STELMA, F. F; SNIJDERS, B; KUMMELING, I; VAN DEN BRANDT, P. A; STOBBERINGH, E. E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 1, p. 511 – 521, 2006.

- PENNA, F. J.; NICOLI, J. R. Influência do colostro na colonização bacteriana normal do trato digestivo do recém-nascido. **Jornal de pediatria**, v. 71, 2001.
- PEREIRA, M. L.; SANTOS, E. J.; SELLOS, I.; BERGDOLL, M. Staphylococci in breast milk from women without mastites. **Revista de Microbiologia**, v. 6, p. 116 – 120, 1995.
- PEREZ, P. F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells. **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 724 – 732, 2007.
- PICCIANO, M. F. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. **Biology Neonate**, v.74, p. 84-93, 1998.
- PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v.48(1), p. 53-67, 2001.
- PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p.133 – 139, 2002.
- QUEIROZ, S. S. O papel do ferro na alimentação infantil. In: Departamento de Nutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Temas de Nutrição em Pediatria**. Nestlé, p. 8 – 9, 2001.
- RAMOS, M. P. P. **Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carreado no leite humano na modulação da microbiota intestinal, na histomorfometria do cólon, na produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio e do nitrogênio em modelo murinho**. 2006. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- REA, M. F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 5, 2004.
- REGO, J.D. **Aleitamento materno**. São Paulo: ed Atheneu, 2002. 518p.
- ROBERFROID, M. R. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. March, p. 830S-837S, 2007.
- RUBALTELLI, F. F.; BIADAIOLI, R.; PECILE, P.; NICOLETTI, P. Intestinal flora

in breast and bottle-fed infants. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 26, p. 186 – 191, 1998.

RODRIGUES, P. A. **Caracterização microbiológica de leite humano de bancos de leite estudos dos efeitos da pasteurização e armazenamento a 7°C e 35°C sobre a população de *Escherichia coli* inoculada**. 2005. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SALYERS, A. A. Bacteroides of the human lower intestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 38, p. 293 – 313, 1984.

SANTOS, M. S; FERREIRA, C. L. L. F; GOMES, P. C; SANTOS, J. L; POZZA, P. C; TESHIMA, E. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1395 – 1400, 2003.

SANTOS, Anna Carolina Accioly Lins. **Uso de probióticos na recuperação da flora intestinal, durante antibioticoterapia**. 39f. Monografia (Pós Graduação) – Instituto de Nutrição, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SANZ, Y; COLLADO, M. C; HAROS, M; DALMAU, J. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. **Acta Pediátrica Española**, v. 62, p. 520 – 526, 2004.

SCARSO, I. S.; VALLE, R. V.; LIRA, B. B.; TEIXEIRA, E. P.; FONSECA, Y. S. K.; ARINE, M. de L. B.; SILVA, R. P. da; DIAS, H. G.; CÂNDIDO, V. L. C.; PACHECO, M. A. S. R; SANTOS, E. A. Análise físico-química e bacteriológica do leite cru e pasteurizado do Banco de Leite Humano de Sorocaba-SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 85-89, 2006.

SERAFINI, A. B.; MARIA CLÁUDIA, D. P. B.; RODRIGUES, M. A. V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C. O.; CAMPOS, M. R. H.; MONTEIRO, E. C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T. F. N Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Revista Saúde Pública [online]**, v. 37, n. 6, p. 775 – 779, 2003.

SHAH, N. P.; WARNAKULSURIYA, E.; LANKAPUTHRA, E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 349 – 356, 1997.

SILVA, V. G.; ALMEIDA, J. A. G. **Crescimento bacteriano em leite humano ordenhado**. In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE, Ribeirão Preto, 2001.

SILVA, A. P.; SOUZA, N. Prevalência do aleitamento materno. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 301-310, 2005.

SILVA, E. R.; ABDALLAH, V. O.; OLIVEIRA, A. M. M. **Qualidade microbiológica do leite humano ordenhado no domicílio: eficácia de uma ação educativa**. In 5ª Semana Acadêmica. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

SILVEIRA, M. M. M. **Aleitamento materno no município de Anápolis: Saberes e práticas na estratégia saúde da família**. 2009. 148p. Dissertação (Mestrado). Centro Universitário Unievangélica, Anápolis, 2009.

SJÖGREN, Y. M; JENMALM, M. C; BÖTTCHER, M. F; BJÖRKSTÉN, B; SVERREMARK-EKSTRÖM, E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. **Clinical e Experimental Allergy**, v. 39, n. 4, p. 518 – 526, 2009a.

SJÖGREN, Y. M; TOMICIC, S; LUNDBERG, A; BÖTTCHER, M. F; BJÖRKSTÉN, B; SVERREMARK-EKSTRÖM, E; JENMALM, M. C. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. **Clinical e Experimental Allergy**, v. 39, p. 1842 – 1851, 2009b.

SNELLING, A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. **Gastrointestinal infections**, v. 18, n. 5, p. 420 – 426, 2005.

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

SONNENBURG, J. L.; XU, J.; LEIP, D. D.; CHEN, C. H.; WESTOVER, B. P.; WEATHERFORD, J.; BUHLER, J. D.; GORDON, J. I. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. **Science**, v. 307, p. 1955 – 1959, 2005.

SPECK, L. M. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2th Ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1984.

TANNOCK, G. W. **The normal microflora: an introduction**. In: Tannock GW, ed. Medical importance of normal microflora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1 – 23, 1999.

TRAHMS, C. M. Nutrição na lactância. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. (Ed) **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, p.187-204, 2002.

TORTORA, FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Porto Alegre. Artmed Editora, 6ª edição. 2000. 827p.

VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEM, S.; OUWEHAND, A. C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 325 – 331, 2007.

VILJANEN, M., SAVILAHTI, E., HAAHTELA, T., JUNTUNEN-BACKMAN, K., KORPELA, R., POUSSA, T., TUURE, T. AND KUITUNEN, M. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allergy**, v. 60, p. 494 – 500, 2005.

VINAGRE, R. D. **O leite humano e sua importância na nutrição do recém nascido prematuro**. São Paulo : Atheneu, 2002. 142p.

VRIEZE, A; HOLLEMAN, F; ZOETENDAL, E. G; DE VOS, W. M; HOEKSTRA, J. B. L; NIEUWDORP, M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. **Diabetologia**, v. 53, p. 606 – 613, 2010.

XU, J; GORDON, J. I. Inaugural article: honor thy symbionts. **Proceedings of the National Academy USA** , v. 100, p. 10452 – 10459, 2003.

ZACARÍAS, M. F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, G.; VINDEROLA, G. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breastmilk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 8, p. 548 – 555, 2011.

ZAHOOR, T; RAHMAN, S. U; FAROOQ, U. Viability of *Lactobacillus bulgaricus* as Yoghurt Culture Under Different Preservation Methods. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, n. 1, p. 46 – 48, 2003.

WEXLER, H. M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 593 – 621, 2007.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 451 – 455, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious disease in less developed countries: a pooled analysis**. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the prevention of infant mortality. *Lancet*, London, v. 355, n. 9202, p. 451-455, Feb. 2000.

YAMAWAKI, N.; YAMADA, M.; KAN-NO, T.; KOJIMA, T.; KANEKO, T.; YONEKUBO, A. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, p. 171 – 181, 2005.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v. 72, p. 317 – 321, 1983.

ANEXO I

Tabela 14. Análise de Variância para acidez, pH, proteína, gordura, umidade cinzas e cloretos

Variáveis	<i>FV</i> ***	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Acidez	Amostra	161,9	9	17,989	7,3101	6E-06	2,1526*
	P.L**	1,268	4	0,317	0,1288	0,971	2,6335
	Erro	88,589	36	2,4608			
	Total	251,76	49				
pH	Amostra	8,6559	9	0,9618	5,0556	0,0002	2,1526*
	P.L	1,993	4	0,4982	2,6191	0,051	2,6335
	Erro	6,8486	36	0,1902			
	Total	17,497	49				
Proteína	Amostra	1,0431	9	0,1159	3,3968	0,0041	2,1526*
	P.L	4,041	4	1,0102	29,609	6E-11	2,6335*
	Erro	1,2283	36	0,0341			
	Total	6,3124	49				
Gordura	Amostra	46,2	9	5,1334	21,946	4E-12	2,1526*
	P.L	6,4432	4	1,6108	6,8864	0,0003	2,6335*
	Erro	8,4208	36	0,2339			
	Total	61,064	49				
Umidade	Amostra	151,45	9	16,828	6,61	2E-05	2,1526*
	P.L	1,9994	4	0,4998	0,1963	0,9387	2,6335
	Erro	91,65	36	2,5458			
	Total	245,1	49				
Cinzas	Amostra	0,049	9	0,0054	1,536	0,1729	2,1526
	P.L	0,1738	4	0,0434	12,265	2E-06	2,6335*
	Erro	0,1275	36	0,0035			
	Total	0,3502	49				
Cloretos	Amostra	0,008	9	0,0009	4,3688	0,0007	2,1526*
	P.L	0,1431	4	0,0358	175,62	4E-23	2,6335*
	Erro	0,0073	36	0,0002			
	Total	0,1584	49				

*significativo a 5% de probabilidade;**período de lactação;***fonte de variação

ANEXO II

Tabela 15. Análise de Variância para mesófilos aeróbios, anaeróbios, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, Coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp, fungos, *Lactobacillus* spp e *Staphylococcus aureus*

Grupos	FV***	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Mesófilos aeróbios	Amostra	85,353	9	9,4836	7,1302	7E-06	2,1526*
	P.L**	8,2184	4	2,0546	1,5447	0,2101	2,6335
	Erro	47,882	36	1,3301			
	Total	141,45	49				
Anaeróbios	Amostra	86,82	9	9,6467	10,631	8E-08	2,1526*
	P.L	5,133	4	1,2833	1,4142	0,249	2,6335
	Erro	32,666	36	0,9074			
	Total	124,62	49				
<i>Bacteroides</i> spp	Amostra	30,838	9	3,4264	8,6424	9E-07	2,1526*
	P.L	0,831	4	0,2078	0,524	0,7187	2,6335
	Erro	14,273	36	0,3965			
	Total	45,941	49				
<i>Bifidobacterium</i> spp	Amostra	25,308	9	2,812	1,6668	0,1336	2,1526
	P.L	5,2683	4	1,3171	0,7807	0,5452	2,6335
	Erro	60,734	36	1,687			
	Total	91,31	49				
<i>Clostridium</i> spp	Amostra	73,53	9	8,17	7,4857	4E-06	2,1526*
	P.L	7,6568	4	1,9142	1,7539	0,1597	2,6335
	Erro	39,291	36	1,0914			
	Total	120,48	49				
Coliformes	Amostra	93,804	9	10,423	5,443	0,0001	2,1526*
	P.L	23,804	4	5,9511	3,1078	0,027	2,6335*
	Erro	68,936	36	1,9149			
	Total	186,54	49				
<i>Escherichia coli</i>	Amostra	56,792	9	6,3102	3,5772	0,0029	2,1526*
	P.L	16,477	4	4,1192	2,3351	0,0741	2,6335
	Erro	63,504	36	1,764			
	Total	136,77	49				
<i>Enterococcus</i> spp	Amostra	144,75	9	16,083	5,508	9E-05	2,1526*
	P.L	14,121	4	3,5302	1,209	0,3239	2,6335
	Erro	105,12	36	2,9199			
	Total	263,98	49				
Fungos	Amostra	24,098	9	2,6776	1,6261	0,1448	2,1526
	P.L	7,3163	4	1,8291	1,1108	0,3665	2,6335
	Erro	59,277	36	1,6466			
	Total	90,692	49				

<i>Lactobacillus</i> spp	Amostra	20,254	9	2,2505	4,0168	0,0013	2,1526*
	P.L	1,0766	4	0,2691	0,4804	0,7499	2,6335
	Erro	20,169	36	0,5603			
	Total	41,5	49				
<i>S.aureus</i>	Amostra	29,397	9	3,2663	2,3853	0,0311	2,1526*
	P.L	3,3085	4	0,8271	0,604	0,6622	2,6335
	Erro	49,297	36	1,3694			
	Total	82,003	49				

*significativo a 5% de probabilidade;**período de lactação;***fonte de variação;

ANEXO III

Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Tecnologia de Alimentos
Carta de informação as voluntárias do trabalho de pesquisa

Prezada voluntária,

Estamos realizando um estudo “Modulação físico-química e microbiológica de leite humano em diferentes fases de maturação” e para isto gostaríamos de contar com sua ajuda. A rotina de trabalho será: responder a um questionário contendo informações sobre nome, idade, idade gestacional, data do parto, endereço, telefone de contato; e por cinco vezes nos períodos (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto) doar aproximadamente 50 ml de leite humano para pesquisa. A coleta será realizada na residência das mesmas por pessoa previamente treinada.

O sucesso deste trabalho dependerá da sua participação, mas esta é voluntária, de forma que poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso informar, da maneira que achar mais conveniente. Por ser voluntária não receberá nenhuma remuneração. O trabalho é de interesse científico e está sob responsabilidade da prof^a. Dr^a. Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, professora da Universidade Federal de Viçosa. A sua identidade será mantida em sigilo e a divulgação dos dados visará apenas mostrar resultados obtidos pela pesquisa. Esse estudo é avaliado por um Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos da UFV. Qualquer transgressão das normas éticas a participante poderá recorrer a esse Comitê dirigindo-se ao seu Presidente: Ricardo Junqueira Del Carlo, pelo telefone: 3899-1269.

Termo de Consentimento

Declaro que recebi todas as informações sobre o trabalho de pesquisa:

“Modulação físico-química e microbiológica de leite humano em diferentes fases de maturação” e que concordo em participar do mesmo.

Assinatura: _____**Viçosa,**

____/____/____