

LUCIANA MARIA BORBA

**EFEITO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO  
DO LEITE HUMANO NO CRESCIMENTO  
DE *Bifidobacterium* spp. “IN VITRO”**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

LUCIANA MARIA BORBA

**EFEITO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO  
DO LEITE HUMANO NO CRESCIMENTO  
DE *Bifidobacterium* spp. “IN VITRO”**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de março de 2001.

---

Prof<sup>a</sup> Sylvia do C.C.Franceschini  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Conselheira)

---

Prof. Nélio José de Andrade

---

Prof. Mauro Mansur Furtado

---

Prof<sup>a</sup> Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira  
(Orientadora)

*Este estudo é dedicado a todas as mães  
doadoras de leite.*

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, pela acolhida e pelos ensinamentos recebidos.

À Coordenação de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Programa PICDT, Ministério de Educação, pelo apoio financeiro.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação e pelos ensinamentos no decorrer de todo o curso e pela compreensão nos momentos difíceis.

À conselheira professora Sylvia do Carmo Castro Franceschini, pelo incentivo e apoio e pela contribuição a esse estudo.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela receptividade, pelas contribuições e sugestões.

Aos professores Nélio José de Andrade e Mauro Mansur Furtado, pelas sugestões a esse trabalho.

Aos Dr. Franz Reis Novak e Dr. João Aprígio Guerra de Almeida, do Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, pela troca de idéias e pelas contribuições.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização desse estudo.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
LISTA DE QUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Leite humano.....	3
2.1.1. Composição do leite humano .....	3
2.1.1.1. Proteínas .....	5
2.1.1.2. Nitrogênio não-protéico .....	7
2.1.1.3. Carboidratos .....	7
2.1.1.4. Lipídeos.....	8
2.1.1.5. Vitaminas .....	9
2.1.1.6. Minerais .....	9
2.1.1.7. Outros componentes .....	10
2.1.2. Características microbiológicas do leite humano.....	10
2.1.3. Efeito do tratamento térmico nos componentes do leite humano .....	13
2.2. Bancos de leite humano.....	14
2.3. Microbiota intestinal humana .....	16

2.3.1. Desenvolvimento da microbiota do trato intestinal do recém-nascido .....	17
2.3.2. Bactérias bífidas .....	20
2.4. A importância do aleitamento materno .....	23
2.5. Bactérias bífidas e a saúde da criança.....	26
2.5.1. Estudos clínicos envolvendo a administração de bactérias bífidas a crianças.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Determinação da qualidade microbiológica do leite humano individual.....	29
3.1.1. Coleta e manutenção das amostras .....	29
3.1.2. Análises microbiológicas .....	30
3.2. Efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de bactérias bífidas .....	31
3.2.1. Coleta e manutenção das amostras .....	31
3.2.2. Obtenção do leite humano de conjunto .....	32
3.2.3. Origem e manutenção das culturas de bactérias bífidas .....	32
3.2.4. Obtenção do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) e do filtrado de leite humano pasteurizado (FLP).....	33
3.2.5. Obtenção do leite humano pasteurizado desnatado (LPD) e do leite humano integral pasteurizado (IPI).....	33
3.2.6. Delineamento experimental.....	34
3.2.6.1. Tratamentos FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado) e FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado) – 1ª etapa.....	35
3.2.6.2. Tratamentos FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado), FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado) e LPi (leite humano integral pasteurizado) – 2ª etapa .....	36
3.2.6.3. Tratamento FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado), FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado), LPd (leite humano pasteurizado adicionado do leite humano pasteurizado desnatado e LPi (leite humano integral pasteurizado).....	37

3.2.7. Perfil eletroforético do filtrado de leite humano não-pasteurizado, filtrado de leite humano pasteurizado e leite humano integral pasteurizado .....	38
3.3. Acompanhamento da viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> spp. em leite humano pasteurizado congelado.....	38
3.3.1. Coleta e manutenção das amostras .....	38
3.3.2. Composição do <i>pool</i> .....	39
3.3.3. Origem e manutenção das culturas .....	39
3.3.4. Produção do concentrado celular.....	39
3.3.5. Delineamento da experimentação .....	39
3.4. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Qualidade microbiológica do leite humano .....	41
4.1.1. Coliformes totais .....	41
4.1.2. Enterococos .....	42
4.1.3. Clostrídios .....	43
4.1.4. Mesófilos aeróbios totais .....	44
4.1.5. Bolores e leveduras .....	45
4.2. Efeito da pasteurização do leite humano no crescimento <i>in vitro</i> de bactérias bífidas.....	46
4.2.1. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	46
4.2.2. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	47
4.2.3. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	50
4.2.4. Perfil eletroforético das proteínas dos filtrados de leite não-pasteurizado (FLNP) e pasteurizado (FLP) e de leite pasteurizado integral (LPi).....	53

	<b>Página</b>
4.3. Acompanhamento da viabilidade de bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado.....	55
4.3.1. Viabilidade das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado durante o período de 15 dias .....	55
4.3.2. Viabilidade das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado por 15 dias, após o descongelamento e refrigeração por 9 horas .....	56
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
APÊNDICE.....	76

## LISTA DE QUADROS

	Página
1 Composição média do leite humano em concentração/dL.....	4
2 Comparação de médias para o crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707, e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	49
3 Comparação de médias para o crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707, e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi) ...	51
1A Grupos microbianos presentes em leite humano coletado por expressão manual (UFC/mL).....	77
2A Grupos microbianos presentes em leite humano coletado com bomba manual (UFC/mL).....	77
3A Grupos microbianos presentes em leite humano coletado no gotejamento da mama (UFC/mL).....	78

	<b>Página</b>
4A Grupos microbianos presentes em leite humano obtido por diferentes técnicas de coleta (Log UFC/mL ± desvio-padrão) .	78
5A Crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	79
6A Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	79
7A Crescimento de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	80
8A Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> AJ32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	80
9A Análise de variância do crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) .....	81
10A Crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	81
11A Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	82
12A Crescimento de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 1507 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	83

13A	Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	84
14A	Análise de variância do crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e em leite humano pasteurizado integral (LPi) .....	84
15A	Crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	85
16A	Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	86
17A	Crescimento de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd) e em leite humano integral pasteurizado (LPi).....	87
18A	Crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)	88
19A	Análise de Variância - Crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707, e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano pasteurizado desnatado LPd), e em leite humano pasteurizado integral (LPi).....	89

	<b>Página</b>
20A Viabilidade de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições) .....	89
21A Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições) .....	90
22A Viabilidade de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15700 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições) .....	90
23A Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições) .....	91
24A Viabilidade de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições) .....	91
25A Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas(média de três repetições) .....	92
26A Viabilidade de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15700 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições) .....	92
27A Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições) .....	93
28A Relação entre a viabilidade celular e tempo de congelamento para <i>Bifidobacterium</i> spp.....	93
29A Relação entre a viabilidade celular e tempo de refrigeração para <i>Bifidobacterium</i> spp.....	93

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Microbiota intestinal na primeira semana após o nascimento (MITSUOKA, 1978).....	21
2 Delineamento experimental para avaliação da qualidade microbiológica de amostras individuais de leite humano.....	31
3 Preparo do <i>pool</i> do leite humano para o estudo do crescimento de bactérias bifidas no leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado ou do filtrado do leite humano pasteurizado ou do leite humano pasteurizado desnatado e em leite humano integral pasteurizado.....	32
4 Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	35
5 Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	36

6	Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	37
7	Preparo do <i>pool</i> do leite humano para acompanhamento da viabilidade das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado (15 dias) e após descongelamento e refrigeração (9 horas).....	40
8	Coliformes totais (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas .....	42
9	Enterococos (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas .....	42
10	Clostrídios (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas .....	43
11	Mesófilos aeróbios (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas .....	44
12	Bolores e leveduras (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas .....	45
13	Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	47
14	Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) e de leite humano pasteurizado integral (LPi) no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e <i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	48
15	Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd) e em leite humano pasteurizado integral (LPi) no crescimento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700, <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 e	50

<i>Bifidobacterium breve</i> AJ 32.....	<b>Página</b>
16 Eletroforese de proteínas do filtrado do leite humano não-pasteurizado, filtrado do leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado.....	53
17 Viabilidade das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado por 15 dias .....	56
18 Viabilidade das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado por 15 dias, descongelado e mantido sob refrigeração por 9 horas.....	57

## RESUMO

BORBA, Luciana Maria, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março 2001.  
**Efeito do processo de pasteurização do leite humano no crescimento de *Bifidobacterium* spp. “in vitro”.** Orientadora: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Conselheiras: Sylvia do Carmo Castro Franceschini e Tânia Toledo de Oliveira.

O leite humano é reconhecidamente superior para a alimentação do recém-nascido. Alguns de seus componentes promovem o estabelecimento de uma microbiota intestinal balanceada, particularmente pela colonização das bactérias bífidas, que confere proteção contra infecções e manutenção da saúde. Os bancos de leite humano atendem os recém-nascidos impossibilitados de receberem o leite de suas próprias mães. O leite nos bancos é pasteurizado, e os efeitos desse processo nas substâncias promotoras do crescimento de bactérias bífidas são praticamente desconhecidos. O objetivo desse estudo foi determinar a qualidade microbiológica de leite humano obtido por diferentes técnicas de coleta; verificar o estímulo ou inibição do leite humano pasteurizado no crescimento de estirpes de bactérias bífidas, de origem humana; e acompanhar a viabilidade dessas bactérias em leite humano pasteurizado congelado. A qualidade microbiológica do leite humano coletado por expressão manual,

bomba manual ou no gotejamento da mama foi analisada para os grupos de coliformes totais, enterococos, clostrídios, mesófilos aeróbios totais, e bolores e leveduras. Os resultados indicaram que os níveis para cada grupo microbiano não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação à técnica de coleta empregada. O estímulo ou inibição do leite pasteurizado no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32 foram avaliados pela inoculação (5%) das culturas ativas em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não pasteurizado, ou do filtrado do leite humano pasteurizado, ou do leite humano pasteurizado desnatado, e em leite humano integral pasteurizado. O leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não pasteurizado promoveu o crescimento das quatro estirpes de bactérias bífidas. Entretanto, os tratamentos leite humano pasteurizado adicionado de filtrado de leite humano pasteurizado, ou de leite humano pasteurizado desnatado, e leite humano integral pasteurizado inibiram o crescimento das quatro estirpes avaliadas. Conclui-se que a pasteurização inibe algum fator que estimula, ou produz algum fator que inibe, o crescimento das estirpes estudadas. A viabilidade das mesmas bactérias adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado foi acompanhada por 15 dias, e após descongelamento e refrigeração por 9 horas. As células permaneceram viáveis durante o congelamento, e após descongelamento e refrigeração, em níveis próximos aos da inoculação, em condições similares às empregadas em um banco de leite. A adição de culturas de bactérias bífidas, de origem humana, ao leite humano pasteurizado nos bancos é uma alternativa para o enriquecimento desse alimento. As culturas podem ser adicionadas na forma de culturas congeladas concentradas, em quantidades previamente determinadas. O produto poderá ser administrado aos bebês, em situações especiais e controladas, como uma contribuição para a colonização do trato intestinal por esse gênero de microrganismos benéficos.

## ABSTRACT

BORBA, Luciana Maria, D.S., Universidade Federal de Viçosa. March 2001.  
**Effect of the human milk pasteurization process upon the growth of *Bifidobacterium* spp. *in vitro*.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Committe Members: Sylvia do Carmo Castro Franceschini and Tânia Toledo de Oliveira.

Human milk is recognized superior for newborn feeding. Some of its components promote the establishment of a balanced intestinal microbiota, particularly the bifidobacteria colonization, that confer protection against infections and the health maintenance. The human milk banks assist the newborn that can't receive its own mothers' milk. The milk in the banks is pasteurized, and the effects of that process in the substances that promotes the growth of bifidobacteria are practically unknown. The objective of this study was to determine the microbiological quality of human milk collected by different techniques; investigate the stimulation or inhibition of pasteurized human milk upon the growth of bifidobacteria of human origin; and follow the viability of a bifidobacteria concentrate added to pasteurized human milk, frozen for 15 days. The microbiological quality of human milk, collected by manual expression, manual pump or dripping milk was analyzed for total coliform, enterococci, clostridia, total aerobic mesophile, and molds and

yeasts. The results indicated that microorganisms levels don't show significant difference regarding the collection technique. The stimulation or inhibition on the growth of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum*. ATCC 15707, and *Bifidobacterium breve* AJ 32 was evaluate by inoculation of the active cultures in pasteurized human milk added of the filtrate of the human milk unpasteurized, or of the filtrate of the pasteurized human milk, or of the skimmed pasteurized human milk, and in pasteurized whole human milk. The pasteurized human milk added of the filtrate of the human milk unpasteurized promoted the growth of the four strains of bifidobacteria. However, pasteurized human milk containing the filtrate of the pasteurized human milk, or skimmed pasteurized human milk, and pasteurized whole human milk inhibited the growth of the four strains. It suggests that the pasteurization inhibits some factor that stimulates, or it produces some factor that inhibits, the growth of the strains studied. The viability of *Bifidobacterium* added to pasteurized and frozen human milk was followed during 15 days, and after thawing and refrigeration for 9 hours. The results showed that the cells remain viable during the storage period under freezing, and after thawing and refrigeration, in the same levels inoculated. This conditions are similar to those found in a human milk bank. The addition of cultures of bifidobacteria, human origin, to human milk pasteurized in the banks is an alternative for the enrichment of that food. The cultures can be added in the form of concentrated frozen cultures, in amounts previously determinated. The product can be administered to the newborns, in special and controlled situations, as a contribution to colonization of the intestinal tract for that genera of beneficial microorganisms.

## 1. INTRODUÇÃO

A excelência do aleitamento materno é mundialmente reconhecida. O leite humano supre as necessidades nutricionais e energéticas do recém-nascido e o protege contra infecções.

Os Bancos de Leite Humano têm um papel relevante no âmbito do aleitamento e promoção da amamentação. Essas unidades distribuem o leite aos recém-nascidos prematuros e com baixo peso ao nascer, que não sugam; recém-nascidos infectados, especialmente com entero-infecções; portadores de deficiências imunológicas; diarréia protraída; alergia à proteínas heterólogas; gemelares; ou em casos excepcionais, a critério médico (BRASIL, 1993; ALMEIDA, 1999).

A alimentação afeta a colonização e o balanço da microbiota do trato intestinal, desde o início da vida. Recém-nascidos exclusivamente amamentados ou alimentados com fórmulas apresentam padrões diferentes nas amostras fecais. Embora em ambos os grupos predominem bactérias bífidas, os níveis populacionais de coliformes, enterococos, e bacteróides são inferiores no primeiro grupo. As bactérias bífidas produzem ácidos orgânicos, acidificando o meio, o que desestimula o crescimento de espécies não benéficas de microrganismos, e mantém o balanço da microbiota intestinal. O pH fecal de bebês amamentados está entre 4,5 – 5,5, e nos alimentados com fórmulas entre 5,7 – 6,7 (MITSUOKA, 1978).

A microbiota balanceada pela presença de microrganismos benéficos tem funções anatômico-fisiológicas e bioquímicas positivas no epitélio intestinal, e apresenta resistência à colonização. Estirpes específicas de bactérias de origem humana, especialmente bactérias bífidas e lactobacilos, são empregadas para promover o equilíbrio da microbiota intestinal, e prevenir ou controlar algumas doenças. A modulação do ecossistema por esses microrganismos resulta na inibição de bactérias não desejáveis e na estimulação do sistema imunológico, entre outras contribuições. Em recém-nascidos, as diarreias de diferentes etiologias podem ser atenuadas ou mesmo prevenidas pela administração de espécies de bactérias ácido-láticas. (FULLER, 1989; GIBSON e WANG, 1994; SAAVEDRA et al., 1994; BENGMARK, 1998; FALK et al., 1998).

A pasteurização do leite humano é, necessariamente, um procedimento de rotina nos Bancos de Leite Humano, garantindo a qualidade sanitária desse alimento (BRASIL, 1993). Entretanto, os efeitos desse tratamento térmico com relação ao estímulo ou inibição de bactérias bífidas são praticamente desconhecidos.

O presente trabalho teve como finalidade verificar a qualidade microbiológica do leite humano recém-ordenhado; investigar os efeitos da pasteurização do leite humano sobre o crescimento de bactérias bífidas, *in vitro*, e acompanhar a viabilidade dessas culturas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado, e após descongelamento, ou seja, nas condições de rotina dos bancos de leite.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Leite humano**

O leite humano é uma mistura complexa de substâncias que proporcionam alimentação e suprimento suficiente para o crescimento e desenvolvimento do lactente, e o protegem contra infecções. Contém carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais, enzimas, imunoglobulinas, hormônios, e fatores de crescimento que nutrem e protegem o recém-nascido no início da vida (VICTORA et al., 1992; FOMON, 1993).

Alguns componentes do leite humano contribuem de forma importante para o estabelecimento da microbiota intestinal do recém-nascido e proteção contra infecções. Fatores protetores, como imunoglobulina A secretora, lactoferrina, lisozima, e oligossacarídeos, entre outros, têm relação com a baixa incidência de infecções observada em bebês amamentados. Algumas proteínas e carboidratos promovem o crescimento de bactérias bífidas, e favorecem a colonização intestinal por esse gênero de microrganismo (LÖNNERDAL, 1985; MITSUOKA, 1989).

#### **2.1.1. Composição do leite humano**

O leite humano apresenta variações em sua composição (Quadro 1). As fases da secreção láctea compreendem o colostro, em média até o 5º dia

Quadro 1 - Composição média do leite humano em concentração/dL

Componente	Concentração/dL
Lactose (g)	7,2
Proteínas (g)	1,0
Nitrogênio não protéico (g)	0,5
Gorduras (g)	3,9
Vitamina A (µg)	67,0
β-caroteno (mg)	1,8
Vitamina D (µg)	0,05
Vitamina E (mg)	0,23
Vitamina K (µg)	0,21
Ácido ascórbico (mg)	4,0
Ácido fólico (µg)	8,5
Ácido pantotênico (mg)	0,18
Biotina (µg)	0,4
Niacina (mg)	0,15
Riboflavina (mg)	0,03
Tiamina (mg)	0,02
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	9,3
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	0,09
Cálcio (mg)	28,0
Cloro (mg)	42,0
Cobre (mg)	0,02
Cromo (µg)	5,0
Ferro (mg)	0,03
Flúor (µg)	1,6
Fósforo (mg)	14,0
Iodo (µg)	11,0
Manganês (µg)	0,6
Magnésio (mg)	3,5
Potássio (mg)	52,5
Selênio (µg)	2,0
Sódio (mg)	18,0
Zinco (mg)	0,12

Fonte: adaptado de LÖNNERDAL (1985; PITKIN e HAMOSH, 1991).

pós-parto, o leite de transição, até o 8º – 10º dia, e o leite maduro, após o 10º dia (VIVERGE et al., 1990a; COPPA et al., 1993). As diferenças na composição são devidas às fases da lactação, idade gestacional, horário da

amamentação, dieta e estado nutricional maternos, doenças, e características genéticas, entre outras. As variações podem ser mais evidentes em relação aos carboidratos e gorduras, e menos acentuadas quanto às vitaminas, minerais, e imunoglobulinas (PITKIN e HAMOSH, 1991; NÓBREGA, 1996).

#### **2.1.1.1. Proteínas**

A composição protéica do leite humano é variada, compreendendo as caseínas e as proteínas do soro. A relação caseína:proteínas do soro é de 30-40:60-70. O leite humano tem de 0,8-1,0 g de proteínas/dL, e cerca de 0,5 g de nitrogênio não-protéico/dL (LÖNNERDAL 1985; PETSCHOW e TALBOOT, 1990).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas são fontes de aminoácidos essenciais e nitrogênio para a síntese protéica; exercem função protetora ou de defesa; e atuam como fatores de crescimento, no caso dos hormônios (PITKIN e HAMOSH, 1991).

As caseínas ( $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína, e  $\alpha$ -caseína) estão na concentração média de 0,25 g/dL no leite maduro. Coagulam em pequenos flocos macios, possibilitando melhor ação enzimática no processo digestivo, em comparação com outros tipos de leite.  $\beta$ -Caseína é a fração predominante e  $\kappa$ -caseína a que está em menor concentração. Ambas contêm carboidratos que liberam glicopeptídeos por ação enzimática. Esses compostos têm efeito promotor no crescimento de bactérias bífidas (NAGASAWA et al., 1970; LÖNNERDAL e FORSUM, 1985; LÖNNERDAL, 1985).

As proteínas do soro, em concentração média de 0,7 g/dL no leite maduro, compreendem um grupo diverso de substâncias, como  $\alpha$ -lactalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, albumina, e enzimas (LÖNNERDAL, 1985).

$\alpha$ -Lactalbumina apresenta um elevado teor nutricional para o lactente devido à sua composição em aminoácidos. O leite maduro tem

cerca de 0,26 g/dL de  $\alpha$ -lactalbumina e não apresenta  $\beta$ -lactoglobulina, presente no leite de vaca e responsável pela intolerância nos lactentes (LÖNNERDAL, 1985).

A lactoferrina é uma glicoproteína, ligante de ferro, presente em nível médio de 0,17 g/dL no leite maduro. Tem ação bacteriostática, indisponibilizando ferro para microrganismos potencialmente patogênicos do trato intestinal. No metabolismo de espécies de bactérias bífidas está envolvida na transferência de ferro diretamente para o microrganismo. Além desse aspecto, afeta favoravelmente a biodisponibilidade de ferro, como observado em bebês amamentados que apresentam uma maior concentração de ferritina sérica (BEZKOROVAINY; 1977; LÖNNERDAL, 1985; MILLER-CATCHPOLE et al., 1997).

As imunoglobulinas, proteínas presentes no leite maduro em concentração média de 0,105 g/dL, são compostos com funções imunológicas. Imunoglobulina A secretora (IgAs) é o componente principal desse grupo, é resistente à proteólise, e sua concentração no primeiro ano de lactação é cerca de 0,5 g/dia. Exerce a função no intestino do recém-nascido amamentado, unindo-se aos antígenos bacterianos ou virais, evitando sua ligação à mucosa intestinal e conseqüente colonização (LÖNNERDAL, 1985; WEAVER et al., 1998).

A albumina sérica, em concentração média de 0,05 g/dL no leite maduro, liga tiroxina, zinco e cobre (LÖNNERDAL, 1985).

A lisozima é encontrada em concentração de cerca de 40 mg/dL no leite maduro. Tem função bacteriostática no trato intestinal do recém-nascido, clivando ligações químicas  $\beta$ -1,4 entre *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilmurâmico na parede celular de bactérias Gram-positivas (SHAHANI et al., 1980; LÖNNERDAL, 1985).

A lipase é uma enzima com especificidade por diferentes substratos, como mono, di e triacilgliceróis, ésteres retinil, ésteres de colesterol. Está em concentração de cerca de 0,001 g/dL no leite maduro e desempenha um papel importante na absorção de gorduras, especialmente em bebês prematuros (SHAHANI et al., 1980; LÖNNERDAL, 1985).

A enzima  $\alpha$ -Amilase está presente na forma de várias isoenzimas, com atividade acentuada no colostro e leite pré-termo. Foi detectada no suco duodenal de bebês amamentados indicando que resiste à passagem pelo trato gástrico (SHAHANI et al.,1980).

Outras enzimas, como lactoperoxidase, galactosiltransferase, sulfidril oxidase, lactose sintetase, desidrogenases dos ácidos láctico e málico, fosfatases, proteases, ribonuclease, xantina oxidase, catalase, oxido-redutases, citocromo-c-oxidase, anidrase carbônica, estão presentes no leite humano, porém ainda são pouco estudadas (SHAHANI et al.,1980; LÖNNERDAL, 1985).

#### **2.1.1.2. Nitrogênio não-protéico**

A fração nitrogênio não-protéico compreende um grupo heterogêneo de compostos de baixo peso molecular, como aminoácidos livres, peptídeos, glicoconjugados, nucleotídeos, poliaminas, uréia, creatinina, creatina, glicosamina, taurina e carnitina entre muitos outros, tendo sido identificados mais de 200 compostos nitrogenados não-protéicos. Especificamente, a carnitina exerce papel importante no metabolismo dos lipídeos que são a principal fonte de energia para o recém-nascido.

Os aminoácidos são cerca de 10% do total presente no leite (PITKIN e HAMOSH, 1991).

As poliaminas, presentes em concentrações de 220 mmol/dl, são essenciais para o crescimento e diferenciação celular (BUTTS, 1996).

Os nucleotídeos podem ter funções no sistema imune, trato gastrointestinal, e metabolismo hepático, porém são sintetizados endogenamente. A ingestão desses compostos provenientes do leite pode ter função importante quando o lactente se encontra em condições especiais, como doenças e limitação de nutrientes CARVER (1996).

Há evidências de que as frações protéica e não-protéica do leite humano estimulam o crescimento de bactérias bífidas. Espécies dessas bactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, e *B. longum*), de origem humana, crescendo em caseína, proteínas do soro, e na fração não-protéica de leite humano foram estimuladas (PETSCHOW e TALBOTT, 1990, 1991).

### **2.1.1.3. Carboidratos**

Essa classe de componentes compreende a lactose e os oligossacarídeos.

A lactose é o carboidrato presente em maior quantidade. A concentração aumenta com o tempo de lactação, com valores médios de 5,16 g/dL no 3<sup>o</sup> dia de lactação, 6,77 g/dL ao final do 1<sup>o</sup> mês, e 7,53 g/dL no 3<sup>o</sup> mês (VIVERGE et al., 1990a).

As bactérias bífidas utilizam a lactose produzindo ácidos orgânicos, que acidificam o meio intestinal e inibem bactérias indesejáveis (MITSUOKA, 1989).

Os oligossacarídeos são, quantitativamente, o terceiro maior soluto no leite humano, depois de lactose e gordura. O leite maduro contém cerca de 1,5 g/dL desses compostos (KOBATA e GINSBURG, 1969).

A estrutura e a composição química dos oligossacarídeos do leite humano têm sido estudadas. Cada oligossacarídeo tem uma combinação variável de glicose, galactose, ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico), fucose e *N*-acetilglicosamina, em muitas ligações diferentes. Há, no mínimo, 130 moléculas diferentes. Esses compostos têm uma variação temporal e individual acentuada. Podem ocorrer variações de até quatro vezes entre diferentes lactantes na mesma fase de lactação (KOBATA e GINSBURG, 1969; VIVERGE et al., 1990b; COPPA et al., 1993).

Os oligossacarídeos podem se ligar a sítios receptores na mucosa intestinal, impedindo a ligação de patógenos, num mecanismo de

exclusão competitiva. As variações em oligossacarídeos podem afetar a capacidade protetora e fisiológica do leite humano fornecido pelos bancos. As moléculas que contêm *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilneuramínico têm, respectivamente, efeito promotor do crescimento de bactérias bífidas e função na recepção de neurotransmissores no sistema nervoso central (VIVERGE et al., 1990b; IDOTA et al.; 1994; KOLETZKO et al., 1998).

#### **2.1.1.4. Lipídeos**

Os lipídeos têm função energética e na formação e desenvolvimento do sistema nervoso. A composição e concentração no leite têm relação direta com a dieta materna. O conteúdo de gordura do leite humano aumenta de 0,2 g/dL no colostro para 0,49 g/dL no leite maduro. As variações ocorrem também durante o ato da amamentação e no decorrer do dia. O leite anterior tem cerca de 0,3 g/dL de gordura em comparação com 0,4 g/dL no leite posterior; pela manhã, a concentração média é de 0,3 g/dL, e à noite, de 0,45 g/dL. Cerca de 99% dos ácidos graxos do leite humano estão na forma de triacilgliceróis; ésteres de colesterol e fosfolipídeos correspondem à fração de 1%, e uma pequena quantidade (< 0,1%) ocorre na forma de diacilgliceróis e ácidos graxos livres (JENSEN et al., 1978; NÓBREGA, 1996; MANSON e WEAVER, 1997).

#### **2.1.1.5. Vitaminas**

Vitamina A e  $\beta$ -caroteno estão presentes no leite maduro em concentração média de, respectivamente, 46,2  $\mu$ g/dL e 18,5  $\mu$ g/dL. A dieta e o estado nutricional maternos influenciam esses valores (GEBRE-MEDHIN et al., 1976).

Vitaminas D, K, e E estão em concentração média, no leite maduro, de, respectivamente, 0,15 µg/dL, 0,2 µg/dL, e 0,25 mg/dL. Vitamina C está presente em torno de 0,55 mg/dL (PITKIN e HAMOSH, 1991).

Biotina pode variar extremamente (0-0,27 µg/dL), e tem relação direta com a concentração plasmática da lactante (PITKIN e HAMOSH, 1991).

A concentração média de ácido pantotênico é 0,26 µg/dL no leite maduro, e está relacionada com a dieta e suplementação maternas (SONG et al., 1984).

Niacina, riboflavina, tiamina, e vitamina B<sub>6</sub> estão presentes em média de, respectivamente, 0,35 µg/dL, 0,7 µg/dL, 0,1 mg/dL, e 0,93 µg/dL, no leite maduro (NAIL et al., 1980; PITKIN e HAMOSH, 1991).

Cianocobalamina tem a concentração média de 0,097 µg/dL, e ácido fólico de 0,85 µg/dL, em leite maduro. A dieta alimentar adequada da mãe não afeta os níveis dessas vitaminas, porém em dieta vegetariana exclusiva, as concentrações encontram-se bastante reduzidas (SANDBERG et al., 1981).

A pasteurização do leite humano nos bancos reduz a concentração de algumas vitaminas, como ácido fólico e cianocobalamina (FORD et al., 1977).

#### **2.1.1.6. Minerais**

Entre os minerais presentes, cálcio, fósforo e magnésio estão em maior concentração, e ferro, cobre, zinco, manganês, selênio, flúor e iodo, em quantidades traço.

A concentração de cálcio no leite maduro é aproximadamente 28 mg/dL, e a maior parte está ligada à caseína. A  $\alpha$ -Lactalbumina é a principal proteína do soro que liga cálcio. Os níveis médios de magnésio e fósforo no leite maduro são de cerca de 3 mg/dL e 14 mg/dL,

respectivamente (FRANSSON e LÖNNERDAL, 1982; LÖNNERDAL, 1985; PITKIN e HAMOSH, 1991).

Cobre, ferro e zinco estão, respectivamente, em concentrações médias de 0,025 mg/dL, 0,03 mg/dL, e 0,12 mg/dL no leite maduro. Manganês, selênio, flúor e iodo, em níveis de cerca 0,6 µg/dL, 2,9 µg/dL, 0,85 µg/dL, e 1,78 µg/dL, respectivamente (RAJALAKSHMI e SRIKANTIA, 1980; LÖNNERDAL et al., 1982; PITKIN e HAMOSH, 1991).

#### **2.1.1.7. Outros componentes**

Os hormônios e fatores de crescimento presentes no leite compreendem os tireoideanos, do córtex adrenal, esteróides sexuais, do hipotálamo e hipófise, gastrointestinais, fatores tipo insulina, epidermais e neurais de crescimento, entre outros (KOLDOVSKY, 1996).

Isoflavonas ou isoflavonóides podem estar presentes se a dieta da mãe inclui alimentos à base de leguminosas, como soja, alimentos funcionais e frutas (FRANKE et al., 1998).

#### **2.1.2. Características microbiológicas do leite humano**

Muitos pesquisadores têm estudado as características microbiológicas do leite humano. Esses estudos avaliaram o leite sob vários aspectos, como a técnica de coleta (expressão manual da mama, ordenha com bomba manual ou mecânica, leite reflexo ou gotejamento da mama), os procedimentos empregados para a higienização de mãos, mamas, frasco e bomba para a coleta, e as condições de armazenamento.

Em todas as amostras analisadas, individuais ou de conjunto, a carga microbiana esteve entre  $1,0 \cdot 10^0$ – $1,0 \cdot 10^7$  UFC/mL. Na maioria das vezes foram identificadas bactérias saprófitas, que podem colonizar o canal lactífero externo ou o mamilo, ou estarem presentes na microbiota

da pele. Entretanto, alguns microrganismos potencialmente patogênicos foram isolados, como estafilococos e enterobactérias.

LIEBHABER et al. (1978) avaliaram a contaminação microbiana do leite obtido por expressão ou bomba, no domicílio das doadoras. As bombas usadas para a obtenção do leite foram imersas em água fervente por 10 minutos ou lavadas em lavalouça doméstica. O leite foi armazenado em *freezer* doméstico por 3 dias e após descongelado e analisado, apresentou contagem total média de  $2,5 \cdot 10^4$  UFC/mL (expressão) e de  $1,35 \cdot 10^6$  UFC/mL (bomba). Nas coletas com bomba, as amostras continham *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

WEST et al. (1979) analisaram o leite obtido sem ou com o descarte de um pequeno volume no início da coleta. As mamas foram higienizadas com água e sabão, secas com toalha, e a coleta foi domiciliar sem supervisão. As amostras ficaram refrigeradas por 3 dias antes de serem encaminhadas ao laboratório. Sem o descarte, a contagem variou entre  $1,5 \cdot 10^2$  e  $1,3 \cdot 10^7$  UFC/mL, e foram isolados *Staphylococcus epidermidis* em até 50% das amostras. *S. aureus* e enterobactérias foram isolados quando o número de bactérias excedeu  $4 \cdot 10^3$  UFC/mL. Com o descarte, a contagem foi de  $2,5 \cdot 10^2$  -  $3,7 \cdot 10^3$  UFC/mL, e foram isolados apenas 1,2% de *S. aureus* e 8,7% de enterobactérias.

ASQUITH et al. (1979) avaliaram o leite coletado separadamente, em dois frascos, um com a porção inicial e o outro com a subsequente. As amostras foram congeladas em *freezer* doméstico por até uma semana, encaminhadas para as análises, e descongeladas sob refrigeração. A contagem total média no leite do primeiro frasco foi de  $3,5 \cdot 10^3$  UFC/mL, enquanto que na amostra subsequente foi de  $7,0 \cdot 10^2$  UFC/mL.

LUCAS e ROBERTS (1979) analisaram o leite obtido por gotejamento da mama e recolhido em frascos higienizados com hipoclorito de sódio ou detergente comum. Nos higienizados com hipoclorito a contagem total média foi de  $2,0 \cdot 10^5$  UFC/mL, e naqueles com detergente, de  $2,0 \cdot 10^7$  UFC/mL.

WILLIAMS et al. (1985) encontraram contagem total de microrganismos entre  $10^3$  e  $10^7$  UFC/mL em leite individual. Identificaram

apenas *Streptococcus viridans* e, ou *Streptococcus epidermidis*, microrganismos saprófitas.

ALMEIDA (1986) analisou leite recém-ordenhado. As contagens foram na ordem de até  $10^7$  UFC/mL para mesófilos;  $10^3$  UFC/mL para coliformes;  $10^4$  UFC/mL para estafilococos;  $10^3$  UFC/mL para termofílicos;  $10^6$  UFC/mL para psicofílicos;  $10^2$  UFC/mL para termofílicos-psicofílicos; e  $10^6$  UFC/mL para fungos e leveduras.

ELWING (1988) verificou a contagem média de  $5,10 \cdot 10^3$  UFC/mL para mesófilos, e de ausência - 0,4 coliformes/mL (número mais provável). O leite foi coletado por expressão ou bomba, após assepsia das mamas feita somente com água destilada esterilizada.

LIN et al. (1988) estudaram o leite individual e de conjunto. As amostras individuais foram obtidas por expressão após desinfecção das mamas com álcool isopropílico 70%, e descarte dos primeiros 2-3 mL. Foram armazenadas a 5°C por no máximo 2 horas. As contagens foram de  $1,3 \cdot 10^1$  a  $5,5 \cdot 10^3$  UFC/mL para aeróbios totais e  $<1,0$  UFC/mL para coliformes. A composição do leite de conjunto foi feita após descongelamento de amostras provenientes de coleta domiciliar com bomba. As amostras foram congeladas, encaminhadas ao banco de leite e descongeladas para a composição do leite de conjunto. Esse foi congelado, descongelado a 4°C por 15 horas e analisado. A contagem média para aeróbios totais foi de  $2,9 \cdot 10^5$  UFC/mL, e para coliformes de  $3,4 \cdot 10^5$  UFC/mL. No leite individual foram isolados somente estafilococos, com predominância de *Staphylococcus epidermidis* (82%). No leite de conjunto, cerca de 45% dos isolados foram enterobactérias e 39%, *Staphylococcus epidermidis*.

NARAYANAN e GUPTA (1989) verificaram contagem microbiana em 34,8% de amostras de leite expressado. 22% foram microrganismos não-patogênicos (*Staphylococcus epidermidis* e esporos aeróbicos) e 12,8%, potenciais patógenos (*Escherichia coli*, *Klebsiella ssp.* e *Staphylococcus aureus*).

PARDOU et al. (1994) analisaram amostras individuais, coletadas por expressão ou bomba. Antes da coleta as doadoras procederam à

lavagem das mãos com sabão e higienização da área dos mamilos com gaze e creme de clorhexidina, ou apenas à higiene dos mamilos e aréolas com água e gaze esterilizadas. Na primeira situação, a contagem total de bactérias variou entre  $6,95.10^3$  e  $2,08.10^4$  UFC/mL; e na segunda, de  $2,40.10^3$  -  $2,85.10^3$  UFC/mL.

A presença de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente foi verificada em cerca de 11% de 500 amostras individuais de leite, e 2 estirpes entre as isoladas produziram enterotoxina quando inoculadas em colostro e meio de cultura (NOVAK et al., 2000).

Atualmente, de acordo com as recomendações do Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, as mãos devem ser lavadas com sabão, água e escova, e as mamas apenas com água e secas em toalha limpa. O uso de sabão ou álcool para higiene das mamas é contra-indicado. O leite coletado é armazenado em frasco esterilizado e pré-estocado sob congelamento. Após a pasteurização, é mantido congelado até o momento do consumo (BRASIL, 1993).

### **2.1.3. Efeito do tratamento térmico nos componentes do leite humano**

O leite humano distribuído nos bancos de leite é pasteurizado. Esse tratamento leva à inativação térmica de 100% dos microrganismos patogênicos e, no mínimo, 90% dos saprófitas, pelo aquecimento a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos ou equivalente (BRASIL, 1993).

No entanto, diferentes tratamentos térmicos do leite humano têm sido avaliados com relação aos efeitos sobre imunoglobulinas (IgA, IgM), lactoferrina, lisozima, vitaminas, e minerais.

A pasteurização tem efeito sobre as imunoglobulinas, lactoferrina, cianocobalamina, ácido fólico, e minerais.

FORD et al. (1977) verificaram que a pasteurização inativou completamente IgM, e IgA foi reduzida em cerca de 22%. Entretanto,

RAPTOPOULOU-GIGI et al. (1977) demonstraram uma redução menor (15%) na IgA em leite pasteurizado.

A redução de lactoferrina pela pasteurização foi de 65%, e lisozima não foi afetada. A concentração de ácido fólico foi reduzida cerca de 10% e cianocobalamina em torno de 50% (FORD et al., 1977).

O aquecimento em temperaturas superiores à de pasteurização também ocasiona perdas de componentes do leite. A 70°C/15 minutos, ocorreu inativação de cerca de 50% de IgA, de 95% de lactoferrina, e de 40% de lisozima. Ácido fólico e cianocobalamina foram reduzidos em, respectivamente, 35% e 66% (FORD et al., 1977).

Em 80°C/15 minutos, as perdas foram de cerca de 20% para IgA, 75% para lisozima, 65% para cianocobalamina, e 75% para ácido fólico (FORD et al., 1977).

A esterilização do leite humano ocasionou perda completa de IgA e lactoferrina (RAPTOPOULOU-GIGI et al., 1977), porém, não alterou a concentração de lisozima, e reduziu cianocobalamina em torno de 40% (FORD et al., 1977).

Quanto aos minerais, zinco, cobre e bromo tiveram uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) de, respectivamente, 3%, 9,4%, e 4,5% (COSTA et al., 2000).

## **2.2. Bancos de leite humano**

A amamentação constituiu-se no mundo todo, até algumas décadas atrás, na forma natural única de nutrição humana nos primeiros meses de vida. Porém, com a revolução industrial e o processo intenso de urbanização, seguidos à 2ª Guerra Mundial, muitas mudanças ocorreram na dinâmica familiar e social, especialmente quanto ao papel da mulher e seus atributos na maternidade. Esses aspectos interferiram no condicionamento sociocultural da amamentação e levaram à introdução da alimentação artificial nas fases iniciais da vida (POSKITT, 1992; NÓBREGA, 1996; ALMEIDA, 1999).

Entre as décadas de 40 e 70, a indústria formou e direcionou elementos culturais de valorização do leite em pó. Introduziu os seus produtos na forma de resposta às necessidades nutricionais dos lactentes, por estratégias voltadas para a formação de opinião junto aos profissionais de saúde. O redirecionamento do papel feminino na sociedade também influenciou essas mudanças (ALMEIDA, 1999).

Historicamente, a posição do Brasil acompanha, de forma semelhante, o que ocorreu em outros países. O declínio da amamentação, acentuado nos anos 70, conduziu ao desmame precoce entre o primeiro e o terceiro meses de vida, agravando os problemas de saúde pública (NÓBREGA, 1996; ALMEIDA, 1999).

A retomada da valorização da amamentação natural iniciou-se, mundialmente, na década de 70, impulsionada por polêmicas entre diferentes grupos sociais e fabricantes de leite em pó. As observações apontavam na direção de um aumento nos índices de morbi-mortalidade infantil. A partir de então, Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) iniciaram uma mobilização em todo o mundo para reverter o quadro presente (AKRÉ, 1994; ALMEIDA, 1999).

A OMS preconiza o aleitamento materno exclusivo durante os primeiros quatro a seis meses de vida, sem que haja a necessidade de administração nem mesmo de líquidos (WHO, 1989).

Entre as muitas iniciativas de promoção e proteção ao aleitamento materno, a OMS mantém o programa denominado de Hospital Amigo da Criança, instituído em 1992 e, desde 1981, adota o Código Internacional de *Marketing* para Substitutos do Leite Humano (WHO, 1981; 1996).

Quanto à iniciativa Hospital Amigo da Criança, há no Brasil cerca de 80 instituições assim designadas. Essas instituições obedecem aos princípios dos Dez Passos para o Sucesso da Amamentação, estabelecidos em 1989 na declaração conjunta OMS/ UNICEF. As instruções são recomendadas para incentivar e orientar as mães na amamentação de seus filhos (WHO, 1989; WHO, 1999).

Em 1996, os países membros da OMS afirmaram suporte ao Código Internacional de *Marketing* para Substitutos do Leite Humano, e alguns países adotaram medidas para o seu cumprimento. Porém ocorrem violações ao código, em vários países, inclusive o Brasil, como distribuição de fórmulas, mamadeiras, brindes e propagandas, entre outras, indicando a necessidade constante de incentivo, monitoramento e implementação de ações que possam garantir as práticas de amamentação (TAYLOR, 1998; REA e TOMA, 2000).

A OMS estima que a média de duração da amamentação é de 18 meses, e que somente cerca de 35% dos bebês com até 4 meses são exclusivamente amamentados. Esses dados foram gerados de um Banco Global de Dados em Amamentação, que reúne as informações disponíveis nos cinco continentes (WHO, 1996).

No Brasil, o Ministério da Saúde mantém o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), que junto à Comissão Técnica de Bancos de Leite Humano, tem a função de documentar e assessorar os Bancos de Leite Humano (BLH). A ação integrada de muitas instituições envolvidas, além de segmentos da sociedade civil organizada, marcaram a década de 80 como o período em que houve importante mobilização em favor da amamentação (BRASIL, 1993; ALMEIDA, 1999).

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o PNIAM desenvolveram, em ação conjunta, a partir de 1985, um programa para promover a expansão quali-quantitativa dos BLH no país. Essa ação resultou em uma Rede Nacional de BLH, e no aumento expressivo do número das unidades de serviço. O BLH do Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, é Centro de Referência Nacional. Pioneiro no país, desempenha um papel central em todas as atividades que envolvem a promoção, proteção e apoio à amamentação (ALMEIDA, 1999).

A recomendação da amamentação exclusiva a todos os recém-nascidos está estabelecida em bases nutricionais e de proteção, que asseguram o crescimento adequado e compensam a imaturidade imunológica natural. Neste contexto, os BLH têm importância cada vez

maior para a saúde pública, garantindo o aleitamento ao recém-nascido impossibilitado de receber o leite de sua própria mãe.

### **2.3. Microbiota intestinal humana**

O estabelecimento da microbiota do trato gastrointestinal no início da vida é um fator importante na proteção contra infecções. Esse ecossistema é complexo e diverso, devido ao grande número de espécies diferentes de microrganismos e suas interações (MITSUOKA, 1989).

O isolamento, identificação e caracterização das espécies presentes no intestino tem sido objeto de muitos estudos. Porém, a avaliação qualitativa e quantitativa constitui um processo extremamente difícil e demorado. A gnotobiologia e as técnicas moleculares têm permitido avanços relevantes para o conhecimento da microbiota. Esses estudos estão possibilitando a compreensão da colonização inicial, da sucessão e dos mecanismos de interação entre os microrganismos e o hospedeiro. (BIAVATI et al., 1982; KOK et al., 1990; TANNOCK et al., 1990; McCARTNEY et al., 1996; FALK et al., 1998)

A microbiota intestinal rapidamente é rapidamente renovável e metabolicamente adaptável. A variedade de substratos disponíveis para o crescimento microbiano reflete a extensão dos diferentes tipos de bactérias que colonizam o intestino. Diferentes espécies se estabelecem gradativamente no trato intestinal, onde interações simbióticas e antagônicas estão constantemente acontecendo. Encontram-se, por exemplo, espécies sacarolíticas, que quebram e fermentam carboidratos complexos; proteolíticas, que degradam proteínas, peptídeos e aminoácidos; e as que intermediam os produtos de metabolismo (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991; PARRET e EDWARDS, 1997).

Muitos fatores podem afetar a composição da microbiota. Esses incluem a idade do hospedeiro e sua susceptibilidade às infecções; interações entre a microbiota e o hospedeiro; a presença e disponibilidade de material fermentável no intestino, e as interações entre os microrganismos, entre outros. O processo da colonização microbiana no

intestino afeta a morfologia, fisiologia, e diferenciação do epitélio mucoso (SALMINEN et al., 1998; COLLINS e GIBSON, 1999; MACKIE et al., 1999).

### **2.3.1. Desenvolvimento da microbiota do trato intestinal do recém-nascido**

O trato gastrointestinal do feto normal é estéril, porém com o nascimento inicia-se a exposição aos microrganismos provenientes da mãe e do meio ambiente. A exposição dos recém-nascidos ocorre também pela alimentação, iniciada com o aleitamento materno. O leite humano tem uma carga microbiana variável, originada dos ductos lactíferos, pele circundante do mamilo, e mãos (ALMEIDA, 1986).

Uma microbiota densa e amplamente diversa, relativamente estável, ocorre pelo estabelecimento gradual de diferentes espécies que interagem constantemente. Esse processo denomina-se colonização, e significa a ocorrência de uma população microbiana balanceada, ao longo do tempo, sem a necessidade de reintrodução periódica. Os microrganismos ocupam nichos particulares, em uma relação que iguala sua taxa de eliminação ou ocorrência naquele sítio (MITSUOKA, 1989; FRETER, 1992).

A colonização ocorre pela aderência às células do epitélio intestinal, favorecida pelo meio apropriado para o estabelecimento das espécies. Embora os mecanismos dessa aderência não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que envolvem a hidrofobicidade das células bacterianas, a presença de moléculas na superfície epitelial que se ligam à parede celular do microrganismo, e, possivelmente, a indução da expressão celular de glicoconjugados fucosilados pela microbiota nativa (SCHAUER, 1997; PÉREZ et al, 1998; BIBILONI et al., 1999).

As bactérias não se distribuem ao acaso através do trato gastrointestinal. A distribuição das espécies e seus níveis populacionais são característicos de regiões específicas. O estômago e o intestino delgado proximal contém números relativamente baixos de microrganismos ( $10^3$ – $10^5$ /g) devido ao baixo pH e fluxo rápido dessa região. O intestino delgado distal mantém uma microbiota mais diversa e um número maior de bactérias ( $10^4$ – $10^8$ /g) que a parte superior. Essa é uma região de transição entre a

microbiota presente e a que coloniza o intestino grosso. Essa região, de baixo *turn-over*, caracteriza-se por elevada densidade e relativa estabilidade populacional de bactérias ( $10^{10}$ – $10^{12}$ /g). No cólon, é estimada a presença de cerca de 400 espécies, embora, de 30 a 40 constituam 99 por cento da microbiota. A composição do material fecal é quase a mesma dessa região (MITSUOKA, 1978; TANNOCK, 1997).

No início da colonização do intestino grosso, o teor elevado de oxigênio no intestino do recém-nascido favorece o crescimento de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, como enterobactérias, enterococos e estafilococos. Com o consumo do oxigênio por estes grupos, o ambiente torna-se altamente reduzido e adequado ao crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, promovendo a proliferação de bifidobactérias, bacteróides e clostrídios. O aumento das populações de anaeróbios estritos, diminui o número das espécies de aeróbios e anaeróbios facultativos, possivelmente devido à redução nos nutrientes utilizáveis em meio com baixo potencial de óxido-redução (MITSUOKA, 1989; MACKIE et al., 1999).

A microbiota no cólon é bastante estável, especialmente quanto aos gêneros dominantes, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. Os grupos com populações menores tendem a apresentar maiores variações, em especial os facultativas como *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Propionibacterium* e *Enterobacteriaceae*. Os números das espécies dominantes são comparáveis nas diversas populações humanas e as espécies menos dominantes diferem amplamente (MITSUOKA, 1996).

Nas primeiras semanas de vida, antes do estabelecimento de uma microbiota intestinal relativamente estável, especialmente quanto à presença de anaeróbios, as bactérias potencialmente patogênicas podem alcançar níveis populacionais elevados. Enterobactérias, como *Escherichia coli*, podem causar infecções intra e extra-intestinais, como gastroenterites, otite média, infecção do trato urinário e septicemia (DEWEY et al., 1995; ADLERBERTH, 1998).

Nos países em desenvolvimento, os recém-nascidos estão expostos a numerosos e diferentes microrganismos. A microbiota adquirida desta forma é instável e pode compreender uma variedade de agentes potencialmente patogênicos. O uso de antibióticos no tratamento de infecções neonatais é também um fator de alteração significativa no balanço microbiano do intestino, tornando o bebê susceptível a novos episódios infecciosos. Em países industrializados a situação pode ser oposta a anterior, porém de comprometimento semelhante. As práticas obstétricas modernas diminuem a transferência de bactérias da mãe ao recém-nascido durante o nascimento, causando um atraso no estabelecimento da microbiota, em especial dos anaeróbios. De forma similar à excessiva exposição, a higiene rigorosa pode retardar o estabelecimento de uma microbiota funcionalmente ativa e de capacidade protetora (ADLERBERTH, 1998).

Os mecanismos de defesa exercidos pela microbiota intestinal são muitos e não estão completamente esclarecidos. Envolvem a ocupação por nichos na mucosa intestinal, competição por substratos, produção de substâncias inibidoras, e o estímulo do sistema imune. Há também a influência de variáveis como a fisiologia do sistema gastrointestinal, a maturidade do sistema imunológico, e as condições higiênico-sanitárias de vida (SALMINEN et al., 1996; SALMINEN et al., 1998).

A alteração na microbiota normal ou no epitélio intestinal ocasiona uma modificação na permeabilidade, facilitando a invasão de microrganismos. No início da vida, a função de barreira não está completamente desenvolvida. A causa mais comum de diarreia em recém-nascidos e crianças é a infecção por rotavírus, associada à permeabilidade aumentada da mucosa intestinal (SALMINEN et al., 1996).

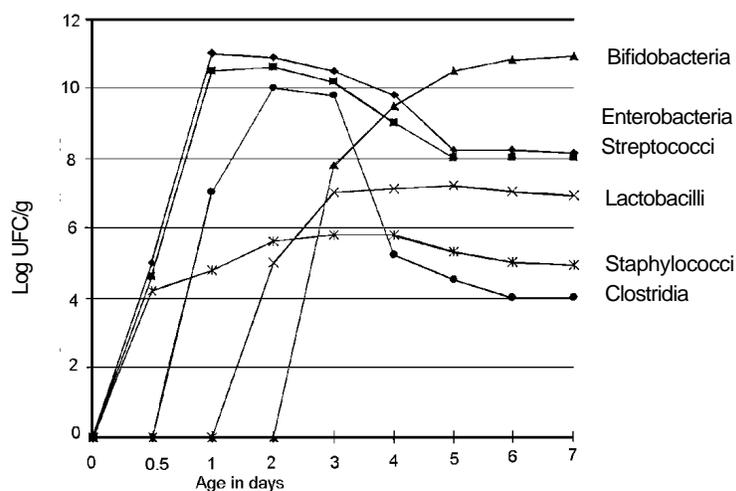
A colonização microbiana é regulada pelas interações entre os microrganismos, substâncias de seu metabolismo, condições fisiológicas do hospedeiro, e nutrientes provenientes da dieta, e as bactérias bífidas são um gênero importante no estabelecimento da colonização intestinal (MITSUOKA, 1978; GIBSON e WANG, 1994).

### **2.3.2. Bactérias bífidas**

As observações de E. Metchnikoff, sobre a influência da microbiota intestinal na longevidade, e o isolamento de bactérias bífidas de fezes de crianças por H. Tissier, há cerca de um século, marcam o início dos estudos dos microrganismos benéficos para a saúde humana (MITSUOKA, 1989).

As bactérias bífidas colonizam o trato intestinal do recém-nascido por volta do 3º dia após o nascimento, em níveis de  $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC/mL. Estão presentes durante toda a vida do indivíduo, embora os níveis populacionais decresçam gradualmente com a idade. As espécies de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* são encontradas em bebês amamentados, e *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum*, nos alimentados com substitutos do leite humano (MITSUOKA, 1978) (Figura 1).

A origem da colonização intestinal por bactérias bífidas ainda não está esclarecida. Muitas proposições têm sido feitas sobre sua aquisição pelo recém-nascido. Os primeiros estudos publicados, revistos por POUPARD et al. (1973) e LUNDEQUIST et al. (1979), sugeriam a transmissão de bactérias bífidas no momento do parto, por contaminação vaginal ou fecal, ou logo após o nascimento pelo contato com o corpo materno, assim como pelo colostro. Os microrganismos foram isolados do trato vaginal de mulheres grávidas e no aspirado gástrico de bebês, embora com baixa incidência. Alguns trabalhos citados por TANNOCK et al. (1990) indicavam o trato vaginal materno como sendo a fonte de colonização das bactérias no trato intestinal do recém-nascido.



## Dias após

Figura 1 - Microbiota intestinal na primeira semana após o nascimento (MITSUOKA, 1978).

Recentemente, TANNOCK et al. (1990), investigaram a transmissão de bactérias da mãe ao filho, pela técnica de determinação do perfil de plasmídeos. As estirpes de bactérias bífidas presentes na mãe (trato vaginal e retal) e no bebê (amostra fecal) foram analisadas. Nos cinco pares mãe-bebê estudados, as bactérias bífidas encontradas nas amostras fecais dos bebês não foram semelhantes às isoladas do trato vaginal das respectivas mães. Em dois dos pares, as bactérias bífidas nas amostras fecais dos bebês tinham o mesmo perfil de plasmídeos que as isoladas da região retal de suas mães. Surpreendentemente, em um dos recém-nascidos, foi observada uma espécie de bactéria bífida no mecônio.

No início da vida, os efeitos benéficos de bactérias bífidas estão relacionados especificamente ao balanço da microbiota intestinal, ao efeito barreira ou resistência à colonização do epitélio, e à estimulação do sistema imunológico, protegendo de modo importante o recém-nascido (CATTO-SMITH, 1996; BRASSART e SCHIFFRIN, 1997; KELLY e COUTTS, 2000).

Os mecanismos estudados incluem a produção de substâncias inibidoras, como ácidos orgânicos e bacteriocinas, inibição competitiva por sítios de aderência às células do epitélio intestinal, competição por nutrientes, e estímulo ou modulação do sistema imune local e sistêmico.

A inibição de *E. coli* por espécies de bactérias bífidas foi investigada por IBRAHIM e BEZKOROVAINY (1993). Seus resultados indicaram que o efeito foi devido à produção de ácidos acético e láctico, e conseqüente acidificação do interior da célula. GIBSON e WANG (1994), verificaram que a inibição de *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella*, e *Vibrio cholerae* por bactérias bífidas foi exercida por mais de um mecanismo de ação, incluindo a produção de substâncias inibidoras e ácidos orgânicos.

A aderência bacteriana ao epitélio intestinal ocorre por interações específicas ou não, entre moléculas e superfícies. É um pré-requisito para a colonização dos microrganismos, benéficos ou patógenos. As propriedades de superfície de bactérias bífidas de origem humana podem ter influência na

aderência, e o alto índice hidrofóbico da superfície celular favorece a ligação, *in vitro*, à células tipo-enterócitos (BEACHEY, 1981; KIRJAVAINEN et al., 1998; PÉREZ et al., 1998).

Com relação à competição por nutrientes, alguns estudos indicam ocorrer com glicose, *N*-acetilglicosamina, e ácido siálico (FULLER, 1991).

O sistema imune no intestino é favorecido pela microbiota intestinal balanceada. No tecido linfóide associado ao intestino, os linfócitos reagem com componentes microbianos, e iniciam a resposta imune, local e sistêmica. A IgAs é produzida por essas células, e recobre a superfície intestinal, impedindo a ligação de microrganismos. Os anticorpos são encontrados também na corrente sanguínea, glândulas salivares e mamárias. A presença de IgAs no leite indica a resposta imune da mãe a partir de seu intestino, e protege o lactente de patógenos. Esses anticorpos não previnem a colonização do recém-nascido pelas bactérias da microbiota normal, mas auxiliam no controle das populações e limitam sua translocação, reduzindo o risco de infecções (PERDIGÓN e ALVARÉZ, 1992; SALMINEN et al., 1998).

A microbiota intestinal normal induz à tolerância imunológica, ou resposta imune auto-limitante, diminuindo a capacidade de reação com bactérias ou seus componentes normalmente presentes. Na presença de um microrganismo potencialmente patogênico no lúmen intestinal, uma resposta imune é desencadeada na mucosa (HANSON et al., 1998).

A influência positiva da colonização por bactérias bífidas é especialmente desejável em bebês prematuros, em que a permeabilidade intestinal pode estar transientemente aumentada (SALMINEN et al., 1996).

## **2.4. A importância do aleitamento materno**

A amamentação exclusiva é a melhor forma conhecida e documentada de nutrir o recém-nascido e protegê-lo infecções, especialmente no primeiro ano de vida. A incidência de doenças infecciosas entre bebês amamentados é menor que nos alimentados com fórmulas (VICTORA et al., 1992; DEWEY et al., 1995).

O aleitamento materno favorece o estabelecimento de uma microbiota intestinal balanceada. Seu perfil é diferente entre recém-nascidos exclusivamente amamentados e os alimentados com substitutos do leite humano. Ambos têm populações semelhantes de bactérias bífidas, entre  $10^{10}$ - $10^{11}$ UFC/mL. Porém, os amamentados têm os grupos de anaeróbios, coliformes e estreptococos em níveis populacionais menores, respectivamente, de  $10^4$ - $10^5$ UFC/mL,  $10^8$ - $10^9$ UFC/mL, e  $10^8$ UFC/mL, enquanto que os alimentados com fórmulas têm as populações desses microrganismos em torno de  $10^8$ - $10^9$ UFC/mL,  $10^9$ - $10^{10}$ UFC/mL, e  $10^9$ - $10^{10}$ UFC/mL, respectivamente (MITSUOKA, 1978).

As bactérias bífidas convertem a lactose do leite em ácidos acético e láctico, diminuindo o pH do meio intestinal. Como o leite humano tem uma capacidade tamponante reduzida, o meio ácido é mantido, inibindo coliformes, outras enterobactérias e enterococos. O desmame da criança altera o perfil da microbiota, que se converte gradativamente ao do adulto (MITSUOKA, 1978).

A microbiota fecal de bebês amamentados ou alimentados com fórmula láctea entre o 4º e 28º dias de vida foi avaliada por BALMER e WHARTON (1989). O primeiro grupo apresentou concentração maior de bactérias bífidas e estafilococos e redução de enterococos. Os bebês alimentados com fórmulas apresentaram populações superiores de *Escherichia coli*, enterococos e clostrídios.

Recém-nascidos, alimentados com leite humano ou fórmulas lácteas, foram monitorados semanalmente, durante os dois primeiros anos de vida. O aleitamento materno foi praticado pelo menos durante o primeiro ano. A incidência de diarreia entre as crianças amamentadas, no primeiro ano de vida, foi a metade da apresentada pelas alimentadas com fórmulas. Para otite média, a infecção foi 19% menor e os episódios prolongados (acima de 10 dias) foram 80% menor nas crianças amamentadas em relação às que recebiam as fórmulas. Durante o segundo ano de vida, as taxas de morbidade não diferiram com relação ao padrão de alimentação, porém, a duração média dos episódios de otite

média foi maior nos bebês alimentados com fórmulas (DEWEY et al., 1995).

NARAYANAN e GUPTA (1980) observaram que os recém-nascidos alimentados com leite humano expressado desenvolveram cerca de duas e meia vezes menos infecções que os alimentados com fórmulas.

A influência da dieta na microbiota intestinal de recém-nascidos foi recentemente reavaliada por RUBALTELLI et al. (1996). A influência de uma fórmula, contendo oligo e polissacarídeos com propriedades bifidogênicas observadas *in vitro* na microbiota fecal, foi comparada com leite humano, ao 4º dia de vida. Nos amamentados prevaleceram as bactérias bífidas e os enterococos foram isolados em 25% dos bebês; nos alimentados com as fórmulas, os enterococos foram detectados em 73% dos bebês.

A proteção conferida pelo leite humano é atribuída aos elementos celulares e aos componentes solúveis, nesses incluídas as substâncias com efeito promotor do crescimento de bactérias bífidas.

Os elementos celulares são neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Sua concentração é elevada no colostro, e decrescem ao final do primeiro mês de lactação. Exercem funções de fagocitose, síntese de lisozima e complemento, e produção de anticorpos (FOMON, 1993).

Os componentes solúveis que tem efeito protetor para o recém-nascido são imunoglobulinas, glicoconjugados, e lactoferrina, entre outros.

O leite tem anticorpos IgAs contra rotavírus, que junto aos complexos de mucina, conferem proteção na gastroenterite por rotavírus. Esses compostos se ligam ao vírus e inibem a infecção. Essa doença pode ser fatal em crianças muito novas ou imunocomprometidas. O aleitamento reduz a severidade e duração dos sintomas associados à essa diarreia viral (YOLKEN et al., 1992; NEWBURG e STREET, 1997).

O aleitamento materno também confere proteção contra agentes de diarreias bacterianas, através dos glicoconjugados. Resultados positivos foram demonstrados em infecções por *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, e *Shigella desinteriae*. A estrutura química desses carboidratos complexos tem homologia estrutural com os encontrados em glicolípídeos e glicoproteínas do epitélio intestinal. Sua ligação às células

impede a dos microrganismos patogênicos (CRAVIOTO et al., 1991; FUJIWARA, et al., 1997; NEWBURG, 1997). A variação em concentração e composição dessas substâncias no leite humano poderia explicar as diferenças no risco de diarreia encontradas em bebês amamentados vivendo em ambientes altamente contaminados (VIVERGE et al., 1990).

A glicoproteína lactoferrina tem atividade antibacteriana. Sua capacidade de ligar ferro inibe o crescimento de bactérias que requerem este elemento. Lactoferrina está envolvida também na transferência de ferro diretamente para bactérias bífidas, num mecanismo de resistência à presença de oxigênio no meio, verificado com *Bifidobacterium breve*. Atualmente, há outro mecanismo em estudo para a ação da lactoferrina. Refere-se à ligação da molécula com lipopolissacarídeos da parede bacteriana, causando alteração de integridade e função (KOT et al., 1995; LÖNNERDAL, 1996; MILLER-CATCHPOLE et al., 1997; NEWBURG, 1997).

Quanto à especificidade dos componentes solúveis do leite, que favorecem o estabelecimento e manutenção de espécies de bactérias bífidas no cólon, vários estudos têm sido publicados.

Os oligossacarídeos, contendo glicose, galactose, ácido *N*-acetilneuramínico, fucose e *N*-acetilglicosamina, não são digeridos no trato gastrointestinal superior e alcançam o cólon, onde são fermentados por bactérias bífidas, promovendo o seu crescimento (MITSUOKA, 1978; GOTHERFORS, 1989)

Glicoproteínas de soro de leite humano maduro, um glicomacropéptido derivado de  $\kappa$ -caseína humana, e glicoconjugados contendo ácido *N*-acetilneuramínico estimulam o crescimento de bactérias bífidas (BEZKOROVAINY e NICHOLS, 1976; AZUMA et al., 1984; IDOTA et al., 1994).

As frações do leite humano (do soro, protéica, e nitrogênio não-protéico) promovem o crescimento de espécies de bactérias bífidas de origem infantil (PETSCHOW e TALBOTT, 1990; 1991).

## **2.5. Bactérias bífidas e a saúde da criança**

A microbiota intestinal é influenciada por diversos fatores, entre esses a dieta. Os recém-nascidos amamentados são beneficiados pelos fatores de crescimento de bactérias bífidas presentes no leite, que favorecem a colonização por esse gênero (MITSUOKA, 1978).

Entretanto, em algumas situações, o aleitamento promovido pelos bancos de leite, pode fornecer aos bebês um suprimento com componentes reduzidos pela pasteurização do leite, ou pela composição variável do leite doado (FORD et al., 1977; VIVERGE et al., 1990).

Em situações especiais, uma suplementação alimentar pode beneficiar os recém-nascidos e as crianças. Os efeitos de bactérias bífidas, administradas a esses grupos, têm sido estudados na prevenção ou tratamento de infecções entéricas. Alguns estudos clínicos têm sido conduzidos, e os resultados indicam que o tratamento ou profilaxia de diarreias infecciosas com esses microrganismos representam uma alternativa viável (MITSUOKA, 1996; BEZKOROVAINY et al., 1997).

Por outro lado, a resistência microbiana é um problema de saúde pública. A OMS recomenda programas para reduzir o uso de antibióticos. Essa forma de terapia, com microrganismos, é denominada de tratamento por interferência microbiana (BENGMARK, 1998).

### **2.5.1. Estudos clínicos envolvendo a administração de bactérias bífidas às crianças**

Os estudos para avaliar os efeitos de bactérias bífidas administradas aos bebês e crianças avaliam a colonização intestinal, a proteção contra doenças diarreicas, o tratamento de infecção por rotavírus, e a prevenção de complicações associadas à antibioticoterapia. A gastroenterite aguda, causada por rotavírus, tem características epidêmicas, e é facilmente contraída, especialmente em ambiente hospitalar. É uma das causas de morbidade e mortalidade infantis, particularmente em países em desenvolvimento (ROLFE, 2000).

BENNET et al. (1992) investigaram a colonização intestinal de onze bebês, entre um e oito meses de idade, que haviam passado por terapia com antibióticos. Administraram duas espécies de bactérias bífidas (*Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum*) e uma de lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*). Ao término do tratamento, isolaram as bactérias bífidas em 80% das amostras fecais. Após 5 e 15 dias, respectivamente, em 70% e 22% das amostras.

As complicações decorrentes de antibioticoterapia com eritromicina diminuíram após a administração de *Bifidobacterium longum* em iogurte (COLOMBEL et al., 1987).

HOOVER (1993) cita os estudos desenvolvidos por TOJO et al. e HOTTA et al.. No primeiro, produtos lácteos fermentados contendo alta concentração de bactérias bífidas, foram administrados às crianças com diarreia por *Campylobacter* ssp, resultando no controle da infecção. No segundo, um preparado contendo bactérias bífidas foi administrado às crianças com diarreia intratável após a antibioticoterapia não ter apresentado resultados. Em uma semana houve melhora dos sintomas.

SAAVEDRA et al. (1994) acompanharam crianças hospitalizadas por doenças não gastrointestinais, e consideradas pacientes de alto risco. A eficácia de uma fórmula contendo *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* na prevenção de diarreia aguda por rotavírus foi demonstrada em 55 bebês e crianças, com idade entre 5 e 24 meses, em um estudo conduzido com um delineamento duplo-cego e placebo-controlado. Os resultados mostraram que a frequência de diarreia foi significativamente menor no grupo que recebeu a fórmula suplementada (7%) em relação ao grupo controle (31%) alimentado com a fórmula sem os microrganismos.

O efeito de fórmula infantil fermentada contendo bactérias bífidas foi avaliado por LANGHENDRIES et al. (1995), pela análise da composição fecal de vinte recém-nascidos nos dois primeiros meses de vida. O produto foi adicionado de *Bifidobacterium bifidum*, após acidificação por *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, e comparado ao leite humano. Embora nos dois grupos tenha prevalecido a

colonização com bactérias bífidas, o pH fecal nos bebês amamentados apresentou valores menores na comparação com os bebês alimentados com fórmulas.

Após a administração de *Bifidobacterium longum* BB536 liofilizado a cinco recém-nascidos de prematuridade extrema, a espécie foi detectada em 2 semanas e entre 2-4 semanas predominou na microbiota intestinal. Depois de 6 semanas, outras espécies tornaram-se dominantes. Quando *Bifidobacterium breve* foi administrado a um grupo semelhante, a taxa de colonização foi maior em relação ao *B. longum* (KIYAMA et al., citados em MORINAGA Ltd., 1995).

Uma pesquisa com leite e fórmula fortificados com *B. lactis* 12, administrados às crianças entre 4 e 36 meses de idade, mostrou uma redução na incidência de diarreia aguda por rotavírus. Em outro estudo, com o mesmo microrganismo, os níveis de IgA foram determinados na saliva de crianças, antes e após a infecção por rotavírus. Os níveis de anticorpos não tiveram elevação significativa nas crianças que haviam sido colonizadas por *B. lactis* 12. No entanto, os níveis de IgA aumentaram nas que não apresentaram indicativo de colonização. A resposta sistêmica dos anticorpos específicos denota a estimulação do sistema imune (HASCHE, 1999).

Alimentos contendo bactérias bífidas como adjuntos dietéticos têm sido desenvolvidos principalmente na forma de produtos lácteos. TAMIME et al. (1995) apresentam uma relação desses produtos. Esses alimentos têm características diversas quanto às culturas e aos processos tecnológicos empregados. Contém uma ou mais espécie de bactéria bífida, associada ou não com outras bactérias lácticas, e são denominados de probióticos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Culturas Láticas, Departamento de Tecnologia de Alimentos, e Banco de Culturas da Universidade Federal de Viçosa.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa com seres humanos, da Universidade Federal de Viçosa, MG.

#### **3.1. Determinação da qualidade microbiológica de leite humano individual**

A qualidade microbiológica foi estudada em 19 amostras individuais de leite humano de 5 doadoras.

##### **3.1.1. Coleta e manutenção das amostras**

O leite humano foi obtido de lactantes doadoras voluntárias, saudáveis, com idade gestacional de termo e parto normal ou cesárea, com tempo de lactação compreendido entre 10-30 dias. Nenhuma das doadoras estava fazendo uso de antibióticos, nem havia passado por tratamento medicamentoso na semana anterior à doação.

As doadoras foram orientadas para procederem à higiene das mãos e dos mamilos antes da coleta, conforme descrito no Manual de Rotinas para Bancos de Leite Humano. O leite foi coletado de acordo com a técnica escolhida pela doadora, ou seja, por expressão manual, ou com bomba manual. Algumas mães têm gotejamento espontâneo do leite, e esse foi igualmente analisado.

Na coleta por expressão manual e no gotejamento da mama, a lactante dispensou o leite diretamente em frasco de vidro esterilizado. Quando foi utilizada bomba manual, devidamente higienizada antes de cada coleta (lavada com água, sabão e escova, e imersa em água fervente por 15 minutos), o leite foi colocado em seguida em frasco esterilizado. A coleta foi realizada na residência das doadoras, de forma supervisionada, e as amostras refrigeradas (caixa com gelo reciclável), foram encaminhadas ao laboratório, e imediatamente analisadas.

### **3.1.2. Análises microbiológicas**

A avaliação da qualidade microbiológica do leite humano recém-ordenhado, *in natura* ou cru (sem ter sido submetido ao processo de pasteurização), foi realizada nas 19 amostras individuais. Essas amostras foram agrupadas de acordo com a técnica de obtenção, ou seja, expressão manual, bomba manual, ou gotejamento da mama.

As amostras foram analisadas, logo após a coleta, para coliformes totais, enterococos, clostrídios, mesófilos aeróbios totais, e bolores e leveduras.

As análises foram feitas por plaqueamento em profundidade, após diluições adequadas em solução de Ringer, nos meios de cultura

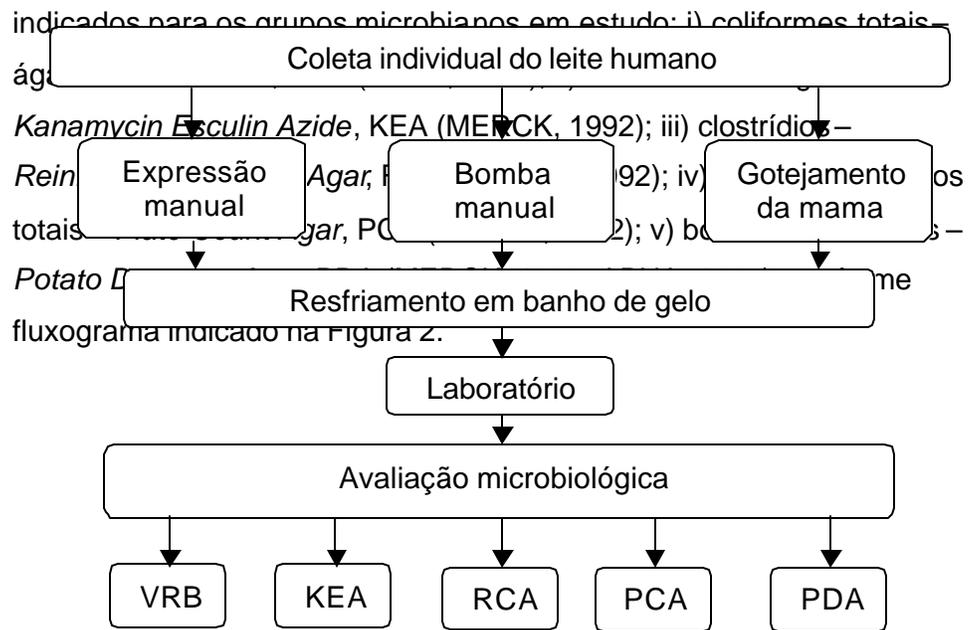
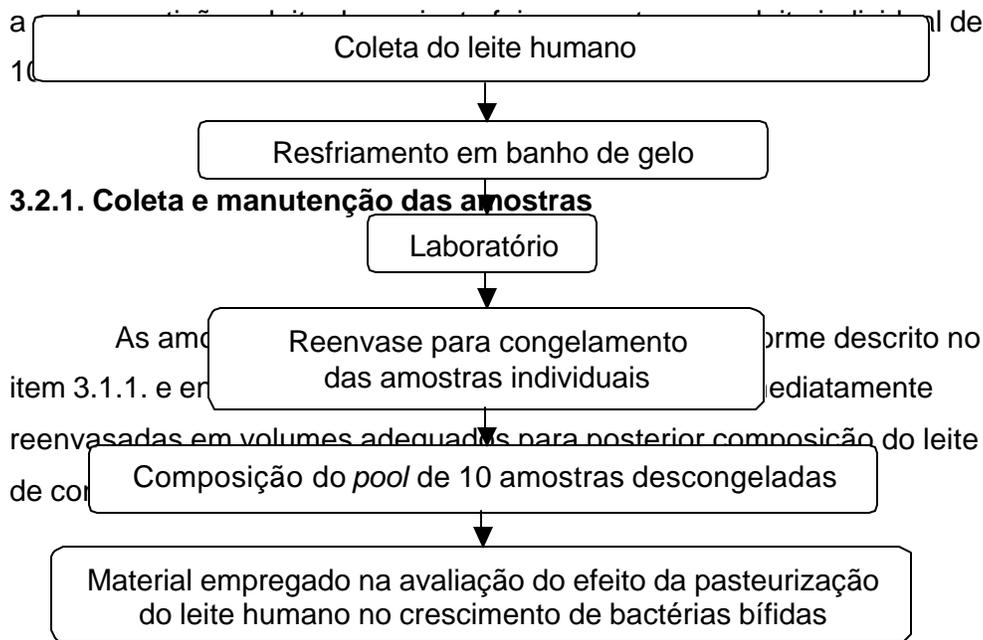


Figura 2 - Delineamento experimental para a avaliação da qualidade microbiológica de amostras individuais de leite humano.

### 3.2. Efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de bactérias bífidas

O efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de bactérias bífidas foi avaliado empregando-se leite humano de conjunto. Foram coletadas 90 amostras de leite individual, de diferentes doadoras, que compuseram o leite de conjunto. A cada etapa da experimentação, e



#### 3.2.2. Obtenção do leite humano de conjunto

O leite de conjunto, para cada etapa experimental, ou repetição, foi composto com o leite de 10 diferentes doadoras, em volumes iguais, após descongelamento em banho de água, no momento da utilização, e de acordo com o fluxograma indicado na Figura 3. Por simplicidade será utilizado o termo *pool* para leite de conjunto.

Figura 3 - Preparo do *pool* do leite humano para o estudo do crescimento de bactérias bífidas no leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado, ou do filtrado do leite humano pasteurizado, ou do leite humano pasteurizado desnatado, e em leite humano integral pasteurizado.

### 3.2.3. Origem e manutenção das culturas de bactérias bífidas

As culturas empregadas nessa experimentação foram inóculos, originados de culturas (isolados humanos) da American Type Culture Collection (ATCC), *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) ATCC 29521, *B. breve* ATCC 15700 e *B. longum* ATCC 15707, e *B. breve* AJ 32, isolada de recém-nascido, obtidas da coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC).

As culturas foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em caldo MRS modificado (0,02%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,01%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,075% ágar-ágar, e 0,05% L-cisteína-HCl) (WIJSMAN et al., In: DUBEY e MISTRY, 1996).

Antes das experimentações, foram descongeladas e ativadas três vezes, em caldo TPY (SCARDOVI, 1986), com incubação a  $37^{\circ}\text{C}/24$

horas, em anaerobiose (jarras com envelopes geradores da atmosfera, GasPak System - BBL).

#### **3.2.4. Obtenção do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) e do filtrado de leite humano pasteurizado (FLP)**

O *pool* do leite humano foi dividido em duas partes. Uma foi mantida sob refrigeração enquanto a outra foi imediatamente pasteurizada (65°C/30 minutos) e resfriada em banho de gelo.

As duas partes foram centrifugadas a 4°C/30 minutos, e desnatadas. Em seguida foram filtradas em membrana (0,45 µm MF - Millipore, Millipore Corporation) (PETSCHOW e TALBOTT, 1991). Esse procedimento é necessário para eliminar a contaminação microbiana (decorrente da coleta) no leite humano não-pasteurizado.

Para a experimentação, os filtrados foram posteriormente adicionados ao leite humano integral pasteurizado, constituindo os tratamentos filtrado do leite não-pasteurizado (FLNP) e filtrado do leite pasteurizado (FLP).

#### **3.2.5. Obtenção do leite humano pasteurizado desnatado (LPD) e do leite humano integral pasteurizado (LPi)**

O *pool* do leite humano foi pasteurizado e dividido em duas partes. Uma foi mantida sob refrigeração, enquanto a outra foi centrifugada a 4°C/30 minutos e desnatada.

Para a experimentação, o leite humano pasteurizado desnatado (LPd) foi posteriormente adicionado ao leite humano integral pasteurizado, constituindo o tratamento leite humano pasteurizado desnatado (LPd).

O leite humano integral pasteurizado (LPi) foi o tratamento Leite humano Pasteurizado integral (LPi). Esse tratamento foi incluído como controle da etapa de filtração do leite humano não-pasteurizado e pasteurizado.

Leite humano pasteurizado integral (LPi) foi também o meio base ao qual foram adicionados os filtrados (FLNP; FLP) e o leite desnatado (LPd).

### **3.2.6. Delineamento experimental**

O estímulo ou inibição do crescimento das bactérias bífidas foi avaliado após inoculação (5%) das culturas ativas, individualmente, em tubos de ensaio contendo cada um dos tratamentos (FLNP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado; FLP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado; LPd: leite humano pasteurizado adicionado do leite humano pasteurizado desnatado; LPi: leite humano integral pasteurizado), seguida de incubação a 37°C/24 horas em anaerobiose (GasPak System–BBL).

A resposta, crescimento microbiano, foi avaliada pela contagem das bactérias bífidas no tempo inicial (momento da inoculação) e após 24 horas de incubação (tempo final). A determinação do número de células viáveis foi feita por meio de plaqueamento em profundidade, após diluições adequadas e em duplicata, em ágar TPY, e incubação a 37°C/48-72 horas, em anaerobiose (GasPak System–BBL). As contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

A experimentação foi conduzida em três etapas distintas, e os tratamentos leite humano integral pasteurizado e leite humano pasteurizado desnatado foram incluídos para eliminar uma possível influência do desnate do leite ou da filtração em membrana no resultado da experimentação, respectivamente.

**3.2.6.1. Tratamentos FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado) e FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado) – 1ª etapa**

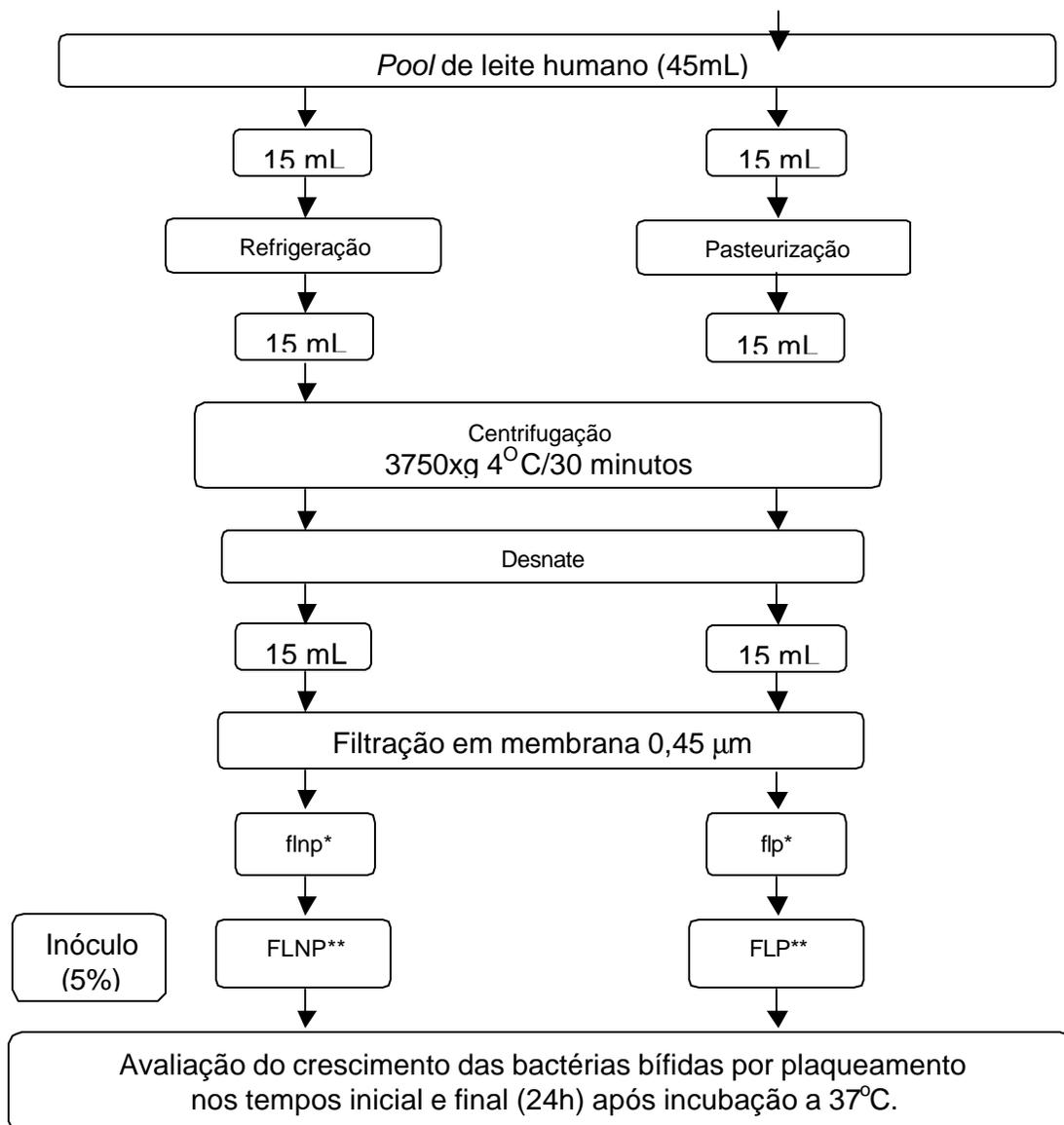


Figura 4 - Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium breve* AJ 32.

---

\* FLNP: filtrado do leite humano não-pasteurizado; FLP: filtrado do leite humano pasteurizado.

\*\* FLNP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado. FLP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado.



**3.2.6.2. Tratamentos FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado); FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado); e LPi (leite humano integral pasteurizado) – 2ª etapa**

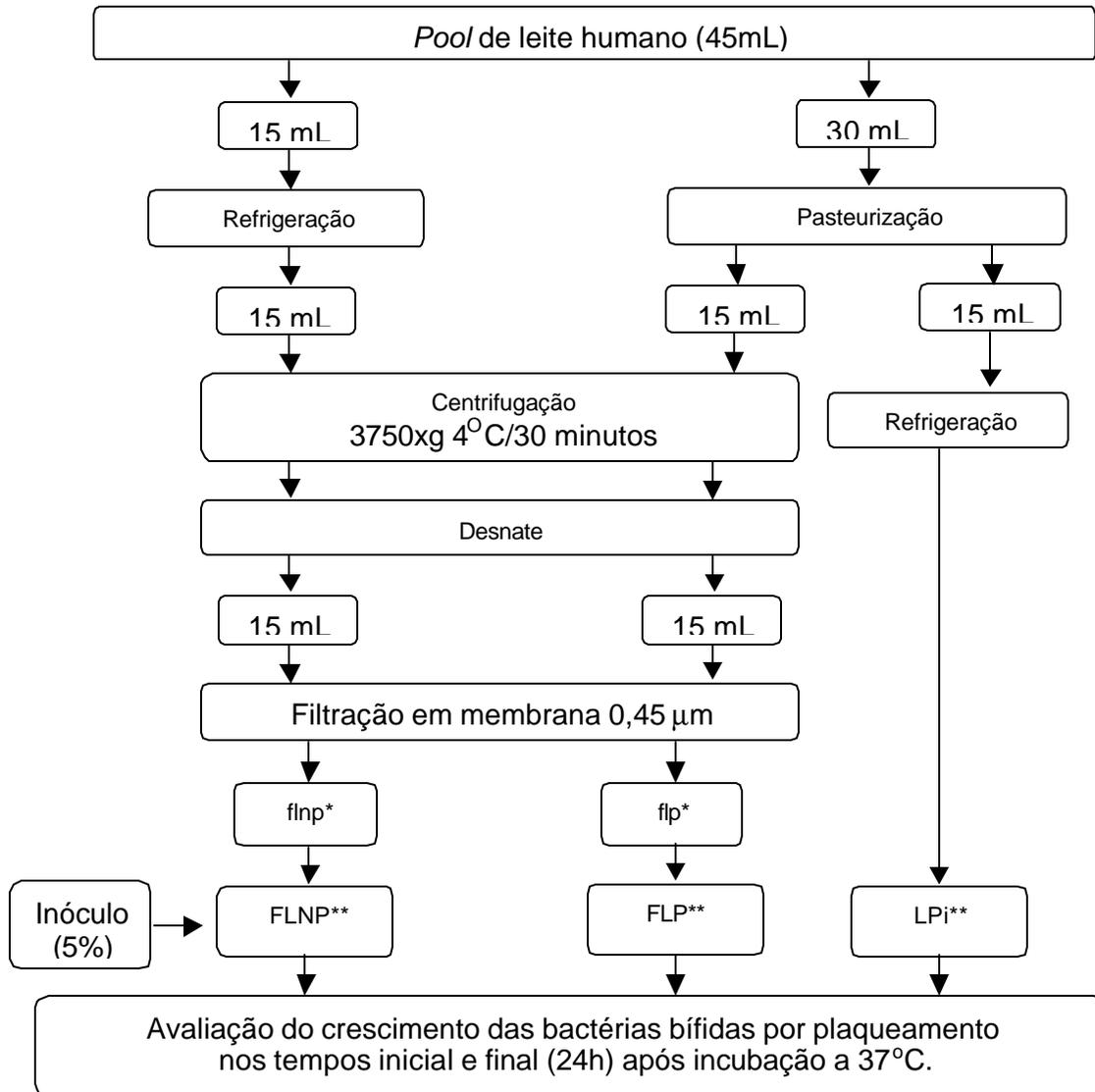


Figura 5 - Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium breve* AJ 32.

\* FLNP: filtrado do leite humano não-pasteurizado; flp: filtrado do leite humano pasteurizado.

**\*\*FLNP:** leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado. **FLP:** leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado; **LPI:** leite humano integral pasteurizado.

**3.2.6.3. Tratamentos FLNP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado); FLP (leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado); LPd (leite humano pasteurizado adicionado do leite humano pasteurizado desnatado); e LPi: leite humano integral pasteurizado**

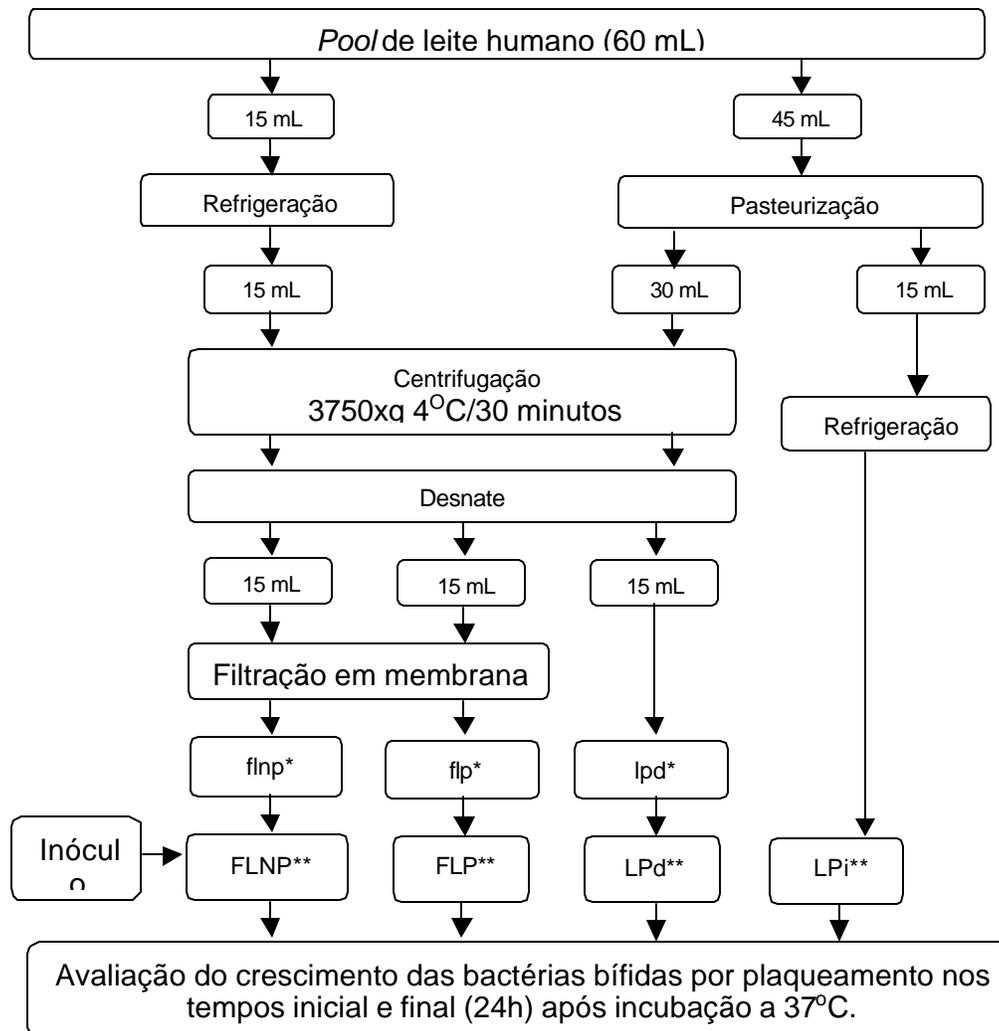


Figura 6 - Delineamento experimental para o efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium breve* AJ 32.

\* FLNP: filtrado do leite humano não-pasteurizado; FLP: filtrado do leite humano pasteurizado; LPD: leite humano pasteurizado desnatado.

\*\*FLNP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado. FLP: leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano pasteurizado; LPd: leite humano pasteurizado adicionado do leite humano pasteurizado desnatado; LPi: leite humano integral pasteurizado.

Os dados do primeiro experimento são os resultados de três repetições em triplicata; os dados dos segundo e terceiro experimentos são os resultados de três repetições.

### **3.2.7. Perfil eletroforético do filtrado de leite humano não-pasteurizado, filtrado de leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em sistema descontínuo em placa (HAMES & RICKWOOD, 1994), foi empregada para as proteínas do leite.

Foram analisados os filtrados do leite humano não-pasteurizado e do leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado, empregando-se volumes de 25 µl de cada amostra, em géis de empilhamento 4% e de separação 9%, sistemas tampão dos géis de empilhamento Tris pH 6,8; de separação Tris pH 8,9; e de corrida ou do eletrodo Tris-glicina pH 9,2. A corrida foi procedida em 100v, por um período de cerca de quatro horas, e a revelação do gel feita com azul brilhante de Comassie.

### **3.3. Acompanhamento da viabilidade de *Bifidobacterium* spp. em leite humano pasteurizado congelado**

A viabilidade das bactérias bífidas em leite humano congelado e após descongelamento foi avaliada empregando-se leite humano de conjunto. Foram coletadas 30 amostras de leite individual, de diferentes doadoras, que compuseram o leite de conjunto. A cada etapa da experimentação, e a cada repetição, o leite de conjunto foi composto com o leite individual de 10 doadoras.

### **3.3.1. Coleta e manutenção das amostras**

As amostras do leite humano foram obtidas conforme descrito no item 3.2.1.

### **3.3.2. Composição do *pool***

O *pool* do leite humano foi composto conforme o item 3.2.2.

### **3.3.3. Origem e manutenção das culturas**

As culturas empregadas nessa experimentação foram originadas e mantidas conforme descrito no item 3.2.3.

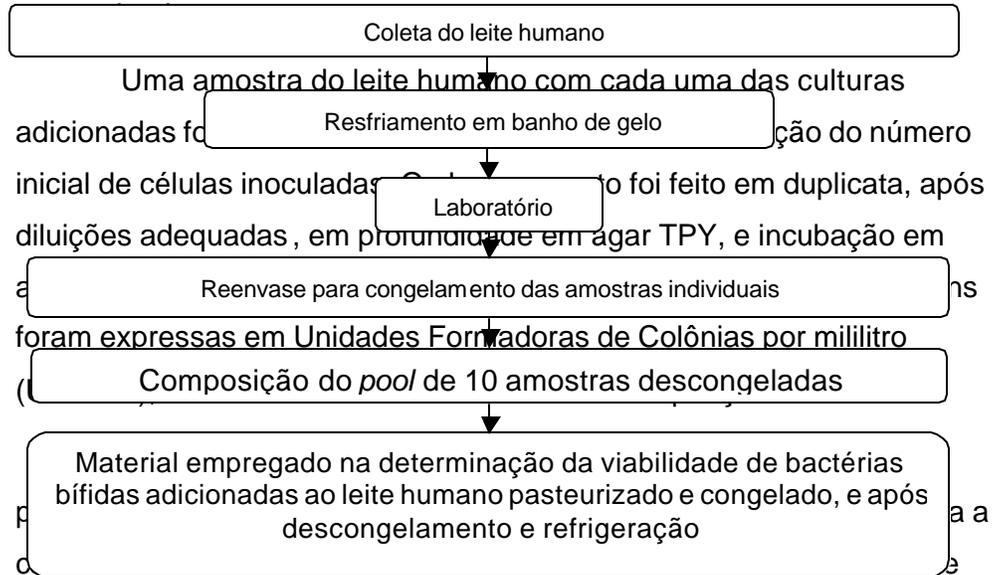
### **3.3.4. Produção do concentrado celular**

As culturas ativadas foram crescidas como indicado anteriormente, em volume de 100 mL, e centrifugadas a 4°C/20 minutos. Esse procedimento foi repetido para a lavagem das células. As células foram ajustadas para volumes conhecidos, com água destilada esterilizada, para a concentração final de  $10^9$  UFC/mL, acompanhada por

densidade ótica, em comprimento de onda de 600µm, em espectrofotômetro.

### 3.3.5. Delineamento da experimentação

O concentrado de células foi adicionado ao *pool* do leite humano



foi acompanhada após o descongelamento do produto e refrigeração por 9 horas. A viabilidade foi determinada por contagem nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os intervalos de tempo avaliados reproduzem as condições de armazenamento do leite humano nos bancos ou berçários, respectivamente, o congelamento (cerca de 15 dias) após pasteurização, até o momento do uso, e o descongelamento e refrigeração (cerca de 9-12 horas), enquanto administrado ao recém-nascido.

A experimento foi conduzido, em três repetições, conforme o fluxograma indicado na Figura 7.

Figura 7 - Preparo do *pool* do leite humano para acompanhamento da viabilidade das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado (15 dias), e após descongelamento e refrigeração (9 horas).

### **3.4. Análise estatística**

Os dados do efeito do leite humano pasteurizado no crescimento de bactérias bífidas foram analisados, para cada espécie em estudo, por Análise de Variância.

Os dados do acompanhamento da viabilidade das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado foram analisados por Análise de Regressão.

As análises estatísticas foram efetuadas com o software SAEG- Universidade Federal de Viçosa, MG.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Qualidade microbiológica do leite humano**

Os resultados obtidos são as médias das contagens microbiológicas nas 19 amostras individuais do leite humano, obtido de 5 doadoras. Dessas amostras, 11 foram coletadas por expressão manual, 4 com bomba manual, e 4 no gotejamento da mama. As análises são apresentadas por grupos microbianos e as contagens encontradas nas amostras são agrupadas de acordo com a técnica de coleta.

#### **4.1.1. Coliformes totais**

A Figura 8 apresenta a média das contagens para o grupo coliformes totais.

A contagem (Log da média de UFC/mL) de coliformes totais foi de 0,38, 1,42, e 1,45, respectivamente para o leite obtido por expressão manual, bomba manual, e gotejamento.

ALMEIDA (1986) encontrou contagens superiores, de até 4,0 (Log UFC/mL), em leite recém-ordenhado. LIN e colaboradores (1988) encontraram valores inferiores a 1,0/mL em leite individual (expressão

manual) de mamas desinfetadas com álcool isopropílico, e entre 1,0 e 5,53 (Log UFC/mL) no *pool* coletado, respectivamente, com bomba manual ou elétrica.

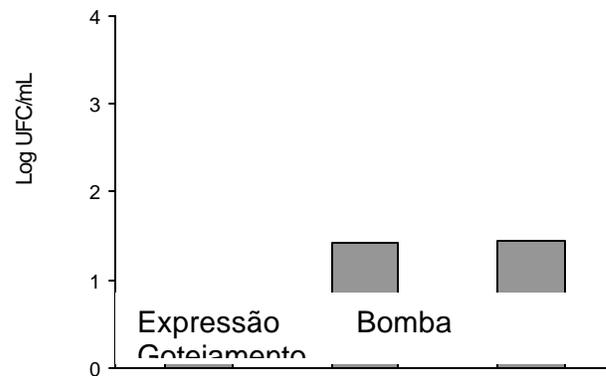


Figura 8 - Coliformes totais (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas.

#### 4.1.2. Enterococos

A Figura 9 apresenta a média das contagens para o grupo dos enterococos.

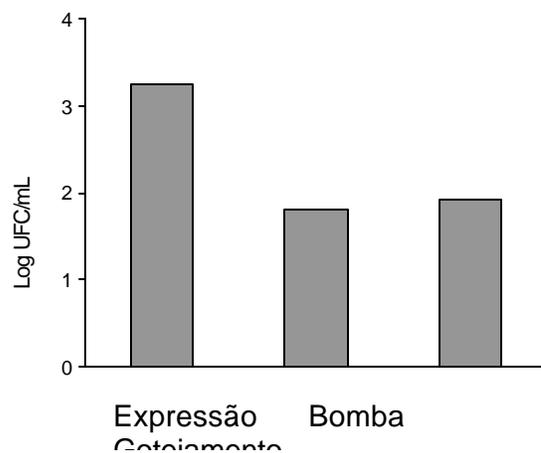
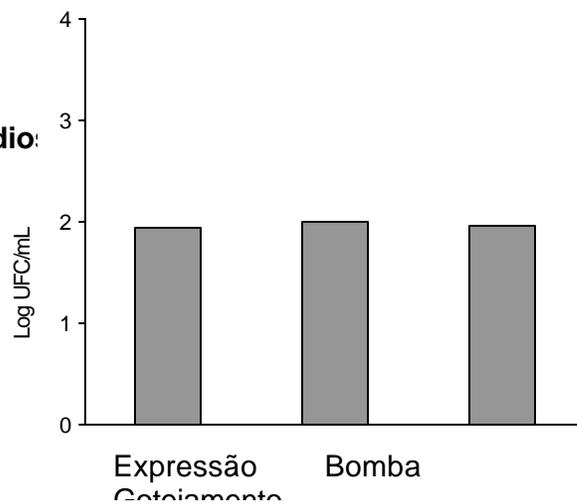


Figura 9 - Enterococos (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas.

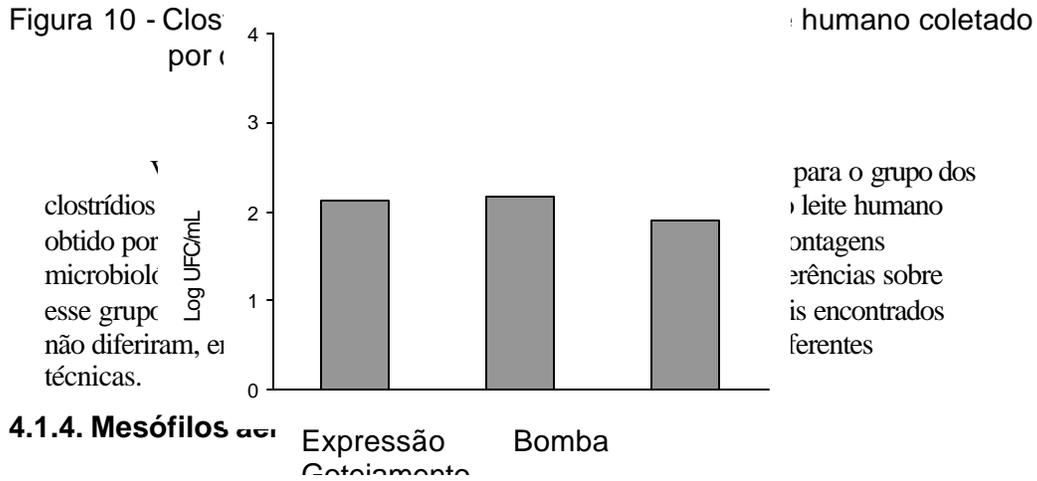
A contagem (Log da média de UFC/mL) encontrada para o grupo dos enterococos foi de 3,24; 1,80; e 1,92; para o leite coletado por expressão, bomba, e gotejamento, respectivamente. Os estudos publicados sobre a bacteriologia do leite humano ordenhado não fazem referência específica a esse grupo de microrganismos. No entanto, observa-se que esses microrganismos estão presentes nas amostras do leite estudadas, independente da técnica de coleta empregada para sua obtenção.

#### 4.1.3. Clostrídio:

A Figura



ira o grupo dos



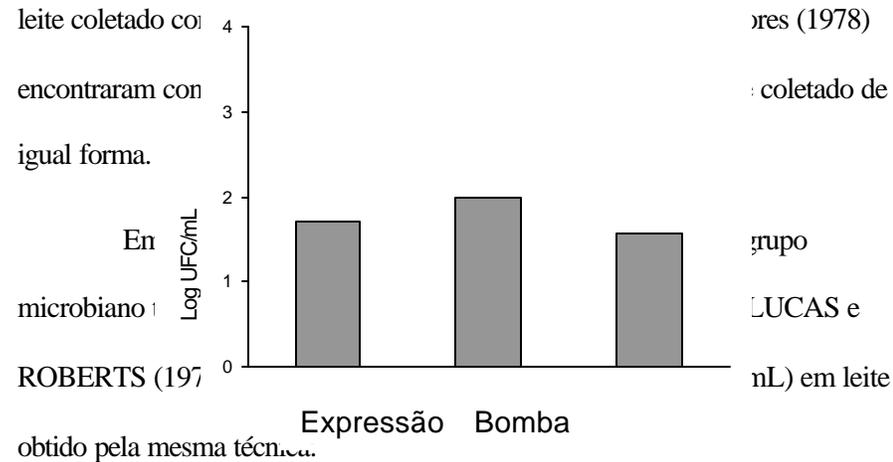
A Figura 11 apresenta a média das contagens para o grupo dos mesófilos aeróbios totais.

Figura 11 - Mesófilos aeróbios (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas.

Para mesófilos aeróbios totais, a contagem encontrada foi de 3,24 (Log da média de UFC/mL) em leite coletado por expressão das mamas. Para esse mesmo grupo de microrganismos, e mesma técnica de coleta, os resultados publicados são variados.

ELWING (1988) verificou contagem média de 3,71 (Log UFC/mL), e PARDOU e colaboradores (1994), entre 3,38 e 3,45 (Log UFC/mL). WEST e colaboradores (1979) encontraram contagens entre 2,18 e 3,00 (Log UFC/mL), e LIN e colaboradores (1988), entre 1,11 e 3,74 (Log UFC/mL). ALMEIDA (1986) encontrou valores de até 8,00 (Log UFC/mL), e LIEBHABER e colaboradores (1978), de, em média, 4,40 (Log UFC/mL).

A contagem (Log da média de UFC/mL) de mesófilos aeróbios totais, em



#### 4.1.5. Bolores e leveduras

A Figura 12 apresenta a média das contagens para o grupo dos bolores e leveduras.

Figura 12 - Bolores e leveduras (Log da média de UFC/mL) em leite humano coletado por diferentes técnicas.

A contagem (Log da média de UFC/mL) para fungos e leveduras foi de 1,71 para leite expressado manualmente, e de 2,00 para o coletado com bomba. ALMEIDA (1986) encontrou contagem de até 7,00 Log UFC/mL para o leite obtido de forma semelhante.

A bomba manual pode ser uma fonte importante de contaminação, segundo os relatos publicados. Porém, observou-se que as contagens no leite coletado com bomba foram próximas às encontradas nas amostras obtidas por expressão manual ou no gotejamento da mama para três dos grupos de microrganismos estudados (clostrídios, mesófilos aeróbios totais, e bolores e leveduras). Para os grupos de coliformes totais e enterococos as contagens encontradas nas amostras de leite expressado diferiram das verificadas nas amostras coletadas com bomba ou no gotejamento, sendo respectivamente inferiores e superiores.

Na coleta por gotejamento da mama, embora tenham sido descartadas as primeiras gotas do leite, ainda que não de modo proposital, a presença de todos os grupos microbianos encontrou-se em níveis semelhantes aos verificados no leite coletado pelas outras duas técnicas. De certo modo, seria de esperar que as primeiras gotas do leite carregariam a maior parte dos microrganismos contaminantes dos canais exteriores das glândulas mamárias, o que não foi observado.

A análise de variância para as técnicas de coleta das amostras do leite humano avaliadas, em relação aos grupos de microrganismos estudados, não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), concluindo-se que a presença dos microrganismos no leite humano ordenhado independe da técnica utilizada para a coleta.

A contaminação secundária do leite humano é devida à presença de microrganismos nos ductos lactíferos externos das mamas, à microbiota epidérmica dos mamilos, regiões circundantes, e mãos da doadora. Essa contaminação é inevitável, e o processo de pasteurização é necessário, salvo em

casos que o leite da mãe destine-se ao próprio filho, e seja devidamente coletado e mantido (WILLIAMS et al., 1985; BRASIL, 1993).

No entanto, o efeito da pasteurização do leite humano sobre o crescimento de bactérias bífidas é pouco estudado.

## 4.2. Efeito da pasteurização do leite humano no crescimento *in vitro* de bactérias bífidas

### 4.2.1. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

A Figura 13 indica o estímulo ou inibição das bactérias bífidas inoculadas em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado ou do filtrado do leite humano pasteurizado.

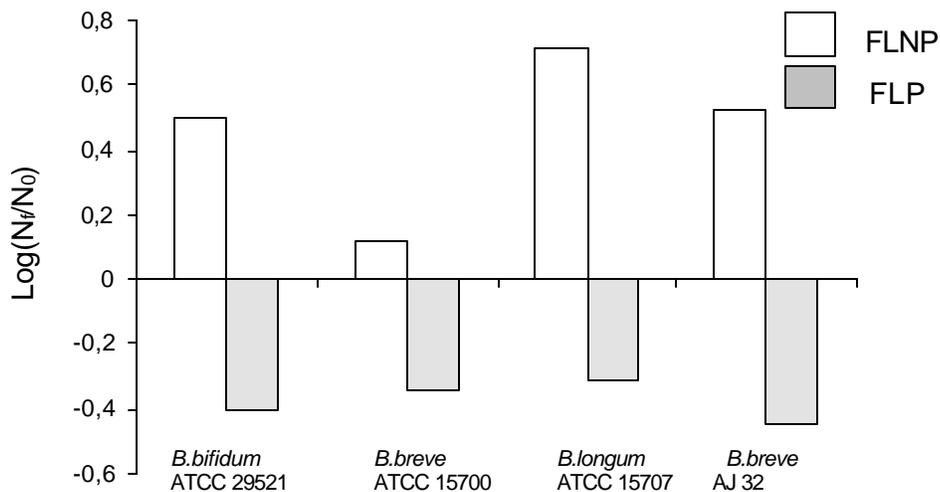
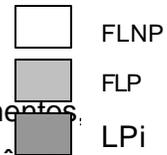


Figura 13 - Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP) no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32.

A análise de variância demonstrou que os dois tratamentos, FLP, diferiram significativamente, ao nível de 5% de significância, para as quatro espécies em avaliação.



**4.2.2. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite pasteurizado (FLP), e de leite humano pasteurizado integral (LPi)**

*B.bifidum* ATCC 29521      *B.breve* ATCC 15700      *B.longum* ATCC 15707      *B.breve* AJ 32

A Figura 14 indica o estímulo ou inibição das bactérias bífidas inoculadas no leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado, ou do filtrado do leite humano pasteurizado, e em leite humano pasteurizado integral.

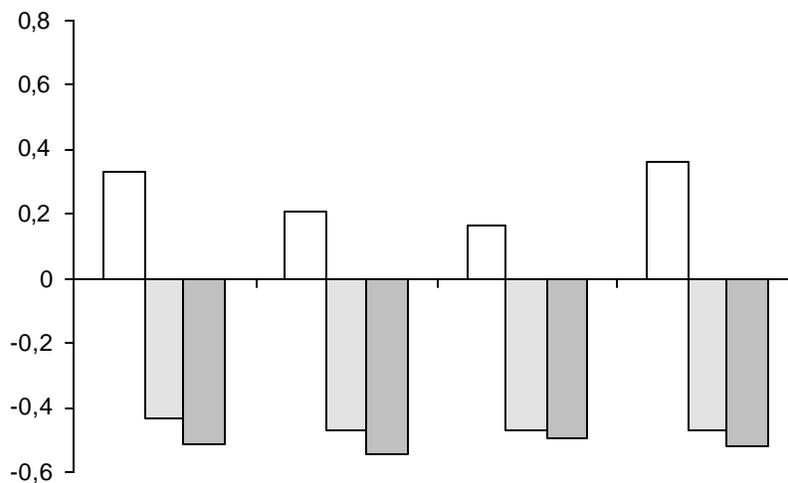


Figura 14 - Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e de leite humano pasteurizado integral (LPi) no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32.

Verifica-se que os microrganismos crescendo em presença de leite humano pasteurizado ou desse leite adicionado de filtrado de leite humano pasteurizado não foram estimulados. No entanto, na presença de leite humano pasteurizado adicionado de filtrado de leite humano que não foi submetido ao processo de pasteurização, os microrganismos foram estimulados. Os resultados dessa experimentação indicam que, princípios presentes no leite humano *in natura*, que estimulam o crescimento de bactérias bífidas testadas, foram inibidos com o tratamento térmico. Os resultados também indicam que não houve influência do processo de filtração em membrana, uma vez que as bactérias inoculadas no leite humano integral pasteurizado e no leite humano pasteurizado adicionado do filtrado de leite humano pasteurizado apresentaram o mesmo comportamento.

A análise de variância demonstrou que o tratamento filtrado do leite humano não-pasteurizado diferiu significativamente dos tratamentos filtrado de leite humano pasteurizado e leite humano integral pasteurizado, ao nível de 5% de significância, para as quatro estirpes em estudo. Os tratamentos filtrado de leite humano pasteurizado e leite humano integral pasteurizado não diferiram significativamente entre si, ao mesmo nível de significância, para as quatro estirpes de bactérias bífidas.

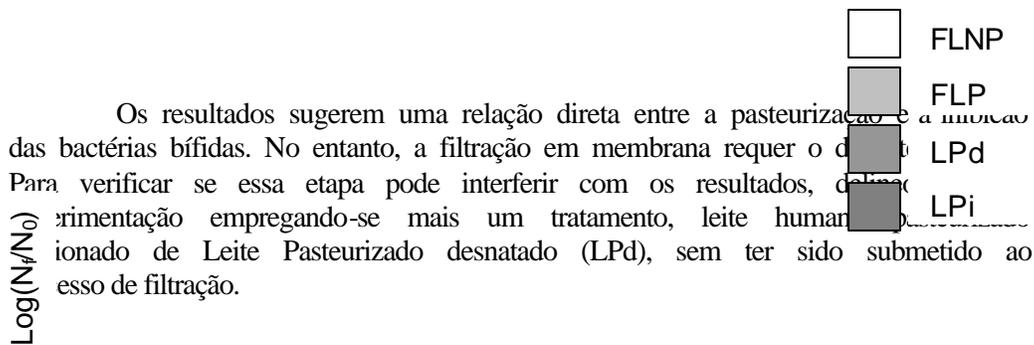
O Quadro 2 apresenta a comparação das médias dos tratamentos.

Quadro 2 - Comparação de médias para o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Cultura	Tratamento	Médias*
ATCC 29521	FLNP	0,3288 a
	FLP	-0,4331 b
	LPi	-0,5157 b

ATCC 15700	FLNP	0,2087 a
	FLP	-0,4711 b
	LPI	-0,5422 b
ATCC 15707	FLNP	0,1615 a
	FLP	-0,4700 b
	LPI	-0,4953 b
AJ 32	FLNP	0,3628 a
	FLP	-0,4691 b
	LPI	-0,5238 b

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.



#### 4.2.3. Estímulo e inibição das bactérias bífidas crescendo em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPI)

*B.bifidum* ATCC 29521      *B.breve* ATCC 15700      *B.longum* ATCC 15707      *B.breve* AJ 32 (FLP), ou

A Figura 15 apresenta o estímulo ou inibição das bactérias bífidas inoculadas em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado, ou do filtrado do leite pasteurizado, ou do leite humano pasteurizado desnatado, e em leite humano integral pasteurizado.

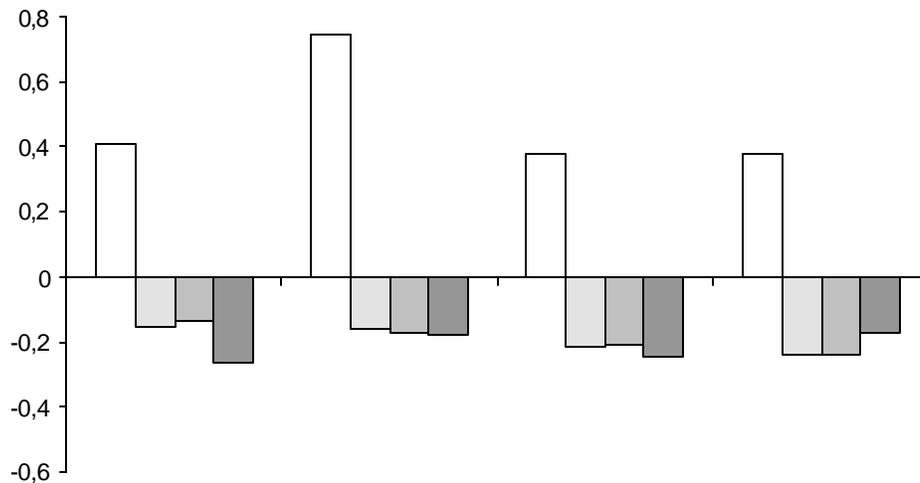


Figura 15 - Efeito do leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd), e em leite humano pasteurizado integral (LPi) no crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32.

Os resultados indicam que o tratamento contendo filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) estimulou o crescimento das quatro estirpes de bactérias bífidas. No entanto, os tratamentos contendo o filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), leite humano pasteurizado desnatado (LPd) e leite humano pasteurizado integral (LPi) inibiram o crescimento das estirpes testadas. Os resultados também mostram que não houve influência do desnate do leite, porque tanto para LPd como LPi o resultado foi o mesmo.

A análise de variância demonstrou que o crescimento das bactérias bífidas em presença do filtrado do leite que não foi submetido ao processo de pasteurização (FLNP) foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) do que o crescimento observado em presença do leite humano pasteurizado ou contendo filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou leite humano pasteurizado desnatado (LPd). No entanto, os tratamentos FLP, LPd, e LPi não diferiram significativamente entre si, ao mesmo nível de significância, para as quatro estirpes de bactérias bífidas.

O Quadro 3 apresenta a comparação das médias dos tratamentos.

Quadro 3 - Comparação de médias para o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve*

AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano pasteurizado desnatado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Cultura	Tratamento	Médias*
ATCC 29521	FLNP	0,4059 a
	FLP	-0,1347 b
	LPi	-0,1597 b
	LPd	-0,2667 a
ATCC 15700	FLNP	0,7481 a
	FLP	-0,1619 b
	LPi	-0,1689 b
	LPd	-0,1733 b
ATCC 15707	FLNP	0,3786 a
	FLP	-0,2099 b
	LPi	-0,2129 b
	LPd	0,2469 b
AJ 32	FLNP	0,3787 a
	FLP	-0,1720 b
	LPi	-0,2383 b
	LPd	-0,2422 b

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Os resultados indicam que a pasteurização é a causa da inibição observada. O tratamento térmico elimina substâncias que estimulam ou produz substâncias que impedem o crescimento ótimo das bactérias bífidas empregadas nessa experimentação.

Dados sobre o efeito da pasteurização do leite humano são escassos.

BEERENS e colaboradores (1980) avaliaram o crescimento de bactérias bífidas, de origem infantil, em leite humano pasteurizado (73°C/10 minutos) e esterilizado (120°C/20 minutos), e verificaram que de cinco estirpes (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, e *B. breve*, a única estimulada foi *B. bifidum*.

Em outro trabalho, com *pool* de leite humano integral pasteurizado após desnate e filtração, *B. bifidum* foi estimulada. *B. infantis* apresentou uma inibição mais acentuada, e *B. longum* e *B. breve* uma inibição menor (PETSCHOW e TALBOTT, 1990).

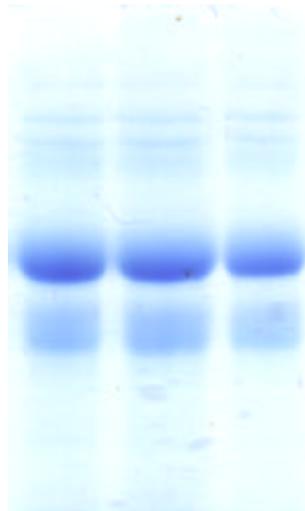
*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, e *B. breve* foram estimuladas em frações caseína, soro, e nitrogênio não-protéico de leite humano (sem tratamento térmico). Os autores concluíram que tanto componentes protéicos como os não-protéicos foram responsáveis pelo estímulo das quatro espécies (PETSCHOW e TALBOTT, 1990, 1991).

Os Bancos de Leite Humano desempenham um papel de grande importância no aleitamento dos bebês que não podem ser amamentados por suas mães. A pasteurização do leite é um processamento necessário. Qualquer alteração ocasionada pela pasteurização do leite, que possa ser desfavorável para o estabelecimento de uma microbiota balanceada no recém-nascido deve ser considerada.

As bactérias bífidas têm requerimentos essenciais de crescimento. Necessitam biotina, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, folato, pantotenato de cálcio, e mesmo riboflavina, que algumas cepas não tem capacidade de síntese, além do aminoácido cisteína (HASSINEN et al., 1951). Sabe-se que os níveis desses nutrientes podem ser comprometidos ou diminuídos pelos tratamentos térmicos.

#### 4.2.4. Perfil eletroforético das proteínas dos filtrados de leite não-pasteurizado (FLNP) e pasteurizado (FLP) e de leite pasteurizado integral (LPI)

A eletroforese de proteínas dos tratamentos em avaliação é apresentada na Figura 16.



flnp\*      flp\*      LPI\*

\* FLNP: filtrado do leite humano não-pasteurizado; FLP: filtrado do leite humano pasteurizado, e LPI: leite humano integral pasteurizado.

Figura 16 - Eletroforese de proteínas do filtrado do leite humano não-pasteurizado, filtrado do leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado.

O resultado da eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida não mostra alteração nas proteínas, para os tratamentos filtrado do leite humano não-pasteurizado, filtrado do leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado. Embora a execução da técnica não tenha incluído marcadores de peso molecular, é possível observar que os perfis protéicos são notadamente semelhantes, sugerindo que não ocorreu alteração detectável na estrutura das proteínas presentes nas amostras avaliadas, que poderia ter sido uma causa para o efeito do tratamento térmico sobre o crescimento das bactérias bífidas.

Sabe-se que o aquecimento pode modificar a estrutura das proteínas. O rompimento das ligações que mantêm as estruturas secundárias e terciárias leva a mudanças conformacionais da molécula. A quebra das ligações não-covalentes, denominada desnaturação, resulta na alteração da estrutura da molécula. A pasteurização é um tratamento térmico relativamente brando, que causa alterações mínimas nas características do leite (FOX e McSWEENEY, 1998).

Informações sobre o efeito de tratamentos térmicos nas proteínas do leite são limitadas. Não foram encontradas informações, até o momento, sobre o efeito do aquecimento nas proteínas do soro do leite humano. Há um número maior de estudos publicados comparando o efeito de diferentes tratamentos térmicos nas proteínas do leite bovino.

Em leite humano, um estudo mostrou que a caseína coagulou em 10 minutos de aquecimento a 140°C, em banho de óleo (SOOD e SIDHU, 1979).

Leite bovino, submetido a oito tratamentos térmicos na faixa de 56-96°C por 30 minutos, foi avaliado. As análises foram feitas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em temperatura de 62°C houve redução inferior a 5%; a 72°C de cerca de 5-10%, e em 77°C, acima de 50% da concentração permaneceu em solução.

A  $\alpha$ -Lactalbumina é a proteína do soro mais resistente ao aquecimento, e em leite bovino a sua desnaturação ocorre em temperatura de 110°C ou superiores. No soro de leite, a desnaturação, coagulação e precipitação das proteínas inicia com aquecimento entre 75-80°C (LARSON e ROLLERI, 1954; MELACHOURIS & TUCKEY, 1966; FOX e SWEENEY, 1998).

Níveis de desnaturação detectáveis nas proteínas do soro não foram observados, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, nas amostras do filtrado do leite humano não-pasteurizado, filtrado do leite humano pasteurizado, e leite humano integral pasteurizado.

A inibição das bactérias bífidas, observada no leite humano pasteurizado, devida à redução ou eliminação de substâncias que estimulam, ou à formação de compostos que desfavorecem, o crescimento ótimo das espécies estudadas, pode ser compensada pela veiculação desses microrganismos no leite humano pasteurizado nos bancos.

Considerando as condições fisiológicas de imaturidade imunológica presentes nos recém-nascidos em geral, e em especial naqueles que recebem o leite pasteurizado dos bancos, há a possibilidade promissora de carrear espécies de bactérias bífidas de origem humana nesse alimento. Dessa forma, a colonização intestinal dos bebês pode ser favorecida e contribuir para o estabelecimento de uma microbiota balanceada, apresentando-se como uma alternativa para promoção da saúde e prevenção de doenças.

Portanto, o acompanhamento da viabilidade de bactérias bífidas de origem humana em leite humano pasteurizado, em condições de banco de leite, se constituiu na etapa naturalmente complementar à da verificação do efeito do processo de pasteurização no crescimento *in vitro* desses microrganismos.

#### **4.3. Acompanhamento da viabilidade de bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado**

##### **4.3.1. Viabilidade das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado durante o período de 15 dias**

A Figura 17 apresenta da viabilidade (Log da média de UFC/mL) das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 dias.

A análise da regressão dos dados demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade das bactérias bífidas durante os 15 dias de congelamento, ou seja, os níveis adicionados mantiveram-se inalterados nas condições avaliadas. Nenhum dos modelos testados nesse procedimento foi estatisticamente significativo, tanto para o teste F, como para o teste t.

Não houve, portanto, variação significativa na concentração das bactérias bífidas adicionadas em leite humano pasteurizado, mantido por 15 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O período de congelamento avaliado corresponde ao tempo médio em que o leite humano pasteurizado permanece estocado nos bancos. Essa condição de armazenamento do leite humano pasteurizado

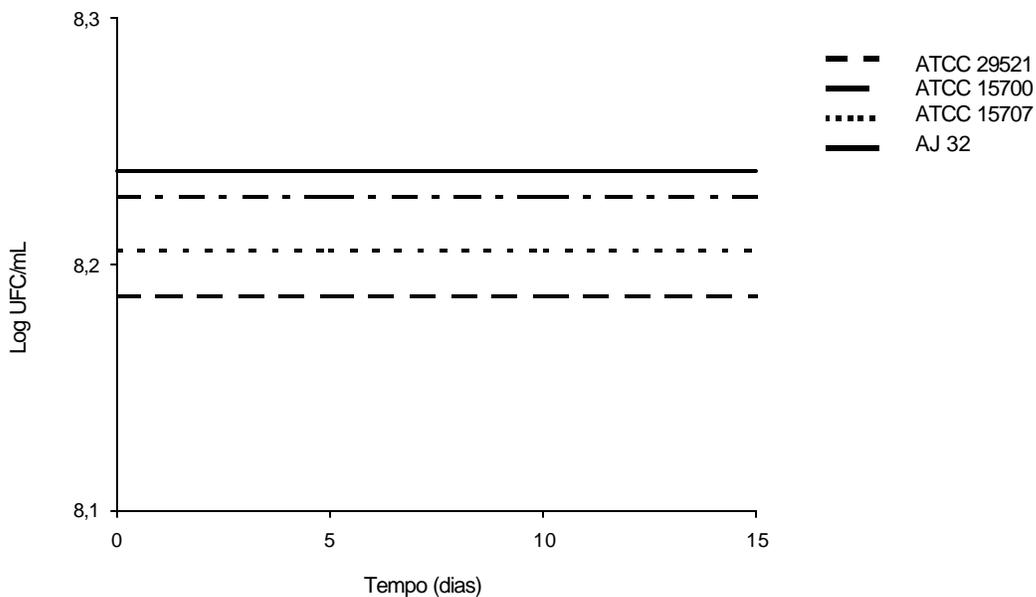
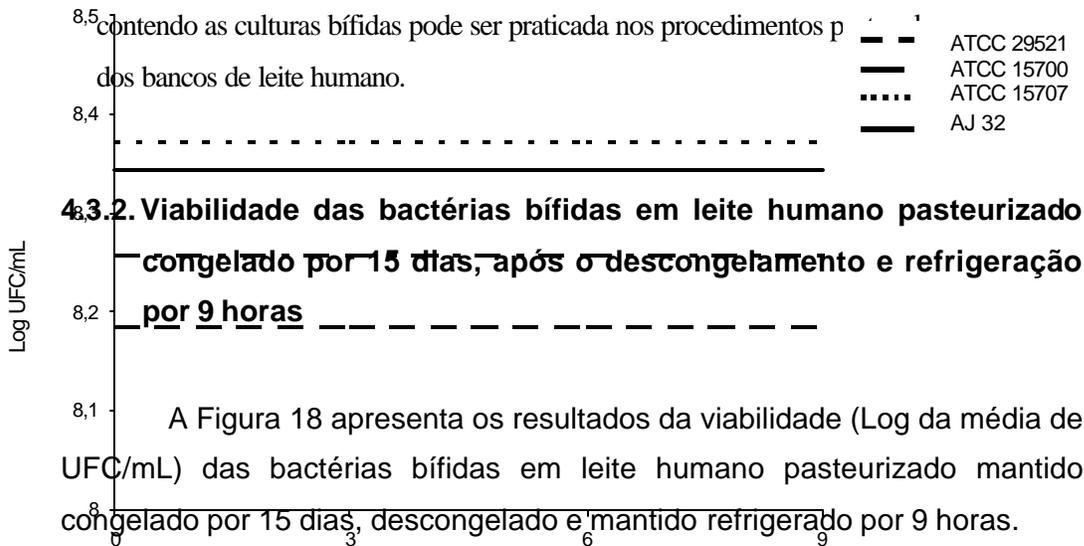


Figura 17 - Viabilidade das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado por 15 dias.



A Figura 18 apresenta os resultados da viabilidade (Log da média de UFC/mL) das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado mantido congelado por 15 dias, descongelado e mantido refrigerado por 9 horas.

O mesmo procedimento (análise da regressão) foi utilizado para analisar os resultados da viabilidade das bactérias bífidas após descongelamento e refrigeração por 9 horas. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis adicionados ao leite humano pasteurizado e os verificados após as condições e tempos avaliados.

Figura 18 - Viabilidade das bactérias bífidas em leite humano pasteurizado congelado por 15 dias, descongelado e mantido sob refrigeração por 9 horas.

Assim como para temperatura de congelamento, e tempo de estocagem, as condições avaliadas após descongelamento são as protocolares em um banco de leite. Verificou-se que os níveis iniciais da cada espécie não foram alterados nessas condições. A viabilidade das células não foi comprometida com o processo de descongelamento e manutenção do leite, praticado nessas instituições, que é de cerca de 9 horas, durante o tempo em que é administrado aos bebês.

Portanto, após descongelamento e na temperatura de refrigeração pelo período de 9 horas, não há variação significativa na viabilidade das bactérias bífidas para nenhuma das estirpes estudadas, indicando que leite humano pasteurizado adicionado de bactérias bífidas pode ser descongelado e mantido refrigerado sem comprometimento da viabilidade celular dos microrganismos.

Os alimentos contendo microrganismos benéficos ao hospedeiro devem atender alguns requisitos, como a origem da espécie, a sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal, a capacidade de sobrevivência e/ou colonização no trato intestinal, a resistência às condições de processamento, e a concentração e viabilidade das células durante a vida de prateleira. A concentração de células viáveis em um produto que reivindica atributos benéficos ao hospedeiro deve ser de pelo menos  $10^7$  UFC/mL (GILLILAND, 1989; HAVERNAAR et al., 1992).

O número de células de bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado foi da ordem de  $10^8$  UFC/mL, superior ao número indicado, uma vez que se desconhecia o efeito do congelamento por 15 dias sobre essas bactérias.

Durante o congelamento, a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 dias, e após o descongelamento e refrigeração por 9 horas, a viabilidade foi mantida, com a concentração dos microrganismos permanecendo no mesmo nível inoculado. Verificando-se que não houve alteração nesse número pelo congelamento e descongelamento, essa concentração pode ser diminuída para os níveis preconizados ( $10^7$  UFC/mL).

O acúmulo de informação sobre os efeitos benéficos dessas bactérias tem justificado sua adição, inclusive em produtos maternizados, como já existem hoje no mercado em forma desidratada.

Além dos atributos benéficos que as bactérias bífidas têm, o leite humano pasteurizado adicionado dessas culturas pode ter um papel preventivo no botulismo infantil.

A infecção resulta da ingestão dos esporos dos microrganismos que colonizam o trato intestinal, multiplicam-se, e produzem a toxina botulínica. O agente etiológico, *Clostridium botulinum*, pode produzir sete tipos

sorologicamente diferenciáveis de neurotoxinas, designadas A a G, sendo que quatro dessas estão atualmente associadas aos casos descritos. Outras espécies, como *C. butyricum* e *C. baratii*, foram também identificados em alguns casos de botulismo infantil (MIDURA e ARNON, 1976; MIDURA, 1996).

Em geral, todas as pessoas estão expostas aos esporos, seja no ambiente ou pela contaminação dos alimentos. O microrganismo é encontrado em amostras de solo e ambientes aquáticos. A fonte da infecção não está totalmente determinada, porém não ocorre transmissão direta. O mel e a poeira têm sido considerados fonte em potencial de *C. botulinum*. No caso do mel, por terem sido isolados esses microrganismos em amostras do alimento que foram ingeridas por crianças que apresentaram a doença. Porém, na maior parte dos casos de botulismo infantil, a origem infecciosa não foi identificada, e somente a minoria dos pacientes acometidos tinham história de consumo desse alimento (HAUSCHILD et al., 1988; MIDURA, 1996).

A susceptibilidade dos recém-nascidos de menos de um ano de idade se deve ao fato de que a microbiota intestinal não está completamente estabelecida, existindo o risco de que os esporos ingeridos encontrem um meio favorável à germinação e colonização do intestino, com conseqüente produção da toxina. Os gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, normalmente presentes em uma microbiota balanceada, demonstraram *in vitro* a capacidade de inibir a multiplicação de *C. botulinum* (WELLS et al., 1982; MIDURA, 1996).

A dieta é um dos fatores importantes na influência da composição da microbiota normal. A ingestão de *Bifidobacterium* spp., adicionado ao leite humano pasteurizado, pelos recém-nascidos atendidos pelos bancos de leite, poderá promover a colonização por esse gênero. Em conseqüência, o meio intestinal ácido decorrente do metabolismo das bactérias bífidas irá desfavorecer a germinação dos esporos de *C. botulinum*. A microbiota balanceada se constitui também em um fator relacionado com prevenção de constipação, que é considerada um fator de risco para o botulismo infantil (SPIKA et al., 1989).

O botulismo infantil atinge crianças no primeiro ano de vida, com incidência maior entre os que têm em torno de 2 meses de idade. Essa forma da doença foi reconhecida, a partir de 1976, como uma entidade clínica distinta. Está incluída como uma das possíveis causas da Síndrome de Morte Súbita Infantil, e a correlação se deve à presença do microrganismo ou da toxina em alguns dos casos investigados (MIDURA e ARNON, 1976; HATHEWAY, 1990).

O espectro de severidade clínica apresentado pela enfermidade abrange desde uma infecção média a uma fulminante, e fatal. O período de incubação é estimado entre 3-30 dias, e o quadro clínico pode ser de difícil reconhecimento em seu estágio inicial. Os sintomas compreendem uma ampla e diversa faixa de episódios, como constipação, apatia, letargia, dificuldade em sugar e engolir, choro fraco, hipotonia, fraqueza muscular geral, e perda do controle da cabeça. O bebê frequentemente parece “frouxo”. Os achados neurológicos incluem oftalmoplegia, reação pupilar lerda à luz, expressão flácida, disfagia, e tônus do esfíncter anal fraco (MIDURA, 1996).

Diferentes diagnósticos têm sido estabelecidos e confundidos com botulismo infantil, incluindo síndrome de Guillain-Barré, encefalite, meningite, hipotireoidismo, sepsis, pneumonia, hipotonia de etiologia desconhecida, miastenia grave, poliomielite (ARNON et al., 1977; ARNON, 1986).

Quando o início é suficientemente gradual para permitir a hospitalização, o prognóstico pode ser bom. O tratamento envolve cuidados respiratórios, incluindo ventilação mecânica, e alimentação nasogástrica ou nasojejunal. Antibioticoterapia e antitoxina botulínica não são indicados para crianças. Há estudos com uma imunoglobulina botulínica derivada de antitoxina humana, cuja ação consiste na inativação da toxina em circulação ou na de fluidos extracelulares, antes que possam se ligar às terminações nervosas (MIDURA, 1996).

Sob esse enfoque, a administração do leite humano contendo espécies de bactérias bífidas de origem humana, é uma alternativa de interesse na área de Saúde Pública. Esse alimento irá contribuir para a saúde e prevenção de doenças do recém-nascido, além papel nutricional bem estabelecido atualmente.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A qualidade do leite humano foi avaliada de acordo com sua técnica de coleta. Foram determinados os níveis de coliformes totais, enterococos, clostrídios, mesófilos aeróbios totais, e bolores e leveduras, nas amostras de leite coletado por expressão manual, bomba manual, e gotejamento da mama. Para coliformes totais, os números encontrados (Log da média de UFC/mL) foram 0,38; 1,42; e 1,45; para as técnicas de expressão, bomba, e gotejamento, respectivamente. Na mesma ordem das técnicas, as contagens encontradas para enterococos foram de 3,24; 1,80; e 1,92; para clostrídios, 1,94; 1,99; e 1,96; para mesófilos aeróbios totais, 2,12; 2,17; e 1,91; e para bolores e leveduras, 1,70; 1,99; e 1,56. Os resultados demonstraram que, independentemente da técnica utilizada, os níveis para cada grupo não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para o estudo do efeito da pasteurização do leite humano no crescimento de bactérias bífidas, delineou-se uma experimentação em que o leite pasteurizado foi adicionado dos filtrados de leite humano não pasteurizado e de filtrado de leite humano pasteurizado. Verificou-se que nos tratamentos em que as bactérias bífidas foram inoculadas em leite humano pasteurizado ou nesse leite contendo filtrado de leite humano pasteurizado houve inibição de todas as estirpes, concluindo-se que a pasteurização inibe algum fator que estimula, ou produz algum fator que inibe o crescimento das estirpes estudadas, que foram *Bifidobacterium*

*bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32.

Partindo-se de uma contagem de cerca de  $10^8$  UFC/mL das mesmas estirpes das bactérias bífidas adicionadas ao leite humano, após congelamento (15 dias), e descongelamento e refrigeração (9 horas), o número de bactérias bífidas continuou nos mesmos níveis ( $10^8$  UFC/mL). Não houve diferença significativa entre os números adicionados antes do congelamento e os números presentes no momento do consumo.

A adição de culturas de bactérias bífidas, de origem humana, ao leite humano pasteurizado nos bancos, pode ser uma alternativa para o enriquecimento desse alimento. A administração desse produto aos bebês, em situações especiais e controladas, pode favorecer o estabelecimento de uma microbiota intestinal balanceada, que confere proteção especialmente frente às infecções entéricas. Essas infecções constituem uma causa frequente de morbi-mortalidade de recém-nascidos, especialmente nos países em desenvolvimento.

O leite humano pasteurizado contendo bactérias bífidas, de origem humana, pode desempenhar um papel protetor frente ao botulismo infantil, que acomete o recém-nascido com menos de um ano de idade, e tem incidência maior entre os que têm cerca de 2 meses de idade.

Conclui-se que as bactérias bífidas podem ser adicionadas ao leite humano pasteurizado e resfriado, antes do congelamento, na forma de culturas concentradas congeladas, e em concentração de  $10^7$  UFC/mL, uma vez que o processamento empregado nos bancos, de congelamento e descongelamento, não afeta esses números. Níveis de  $10^7$  UFC/mL são suficientes para promover as modificações necessárias no cólon, local de atuação dessas bactérias.

Como continuação desse trabalho, sugere-se uma avaliação *in vivo*, do estímulo e inibição do leite humano pasteurizado e não pasteurizado, na microbiota intestinal de recém-nascidos, estudando-se a alteração dos grupos microbianos principais.

Sugere-se também que as variações individuais na composição do leite humano, especialmente em relação ao estado nutricional das doadoras, sejam estudadas para validar sua influência no crescimento de bactérias bífidas.

Alguns bancos de leite humano procedem ao descongelamento do leite pasteurizado por microondas. Sugere-se, portanto, que o efeito de microondas na viabilidade das culturas de bactérias bífidas adicionadas ao leite humano pasteurizado seja avaliado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERBERTH, I. Estabelecimento da microflora intestinal normal do recém-nascido. In: HANSON, L.A., YOLKEN, R.H. (Eds.) **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Nestlé Nutrition Workshop Series. Nestec Ltd. Vevey. Suíça. p.1-3. 1998.
- AKRÉ, J. (Ed.) **Alimentação Infantil**: Bases fisiológicas. Genebra: Organização Mundial de Saúde. 1994. 97p.
- 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.G. **Amamentação**. Um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 1999. 120p.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C. 1992. 1219p.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington, D.C. 1985.
- ARNON, S.S. Infant botulism: anticipating the second decade. **J. Infect. Dis.**, v.154, p.201-206, 1986.
- ARNON, S.S., MIDURA, T., CLAY, S.A., WOOD, R.M., CHIN, J. Infant botulism: epidemiological, clinical, and laboratory aspects. **JAMA**, v.237, p.1946-1951, 1977.

- ASQUISTH, M.T., HARROD, J.R. Reduction of bacterial contamination in banked human milk. **J. Pediat.**, v.95, p.993-994, 1979.
- AZUMA, N., YAMAUCHI, K., MITSUOKA, T. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human *k*-casein. **Agric. Biol. Chem.**, v.48, n.8, p.2159-2162, 1984.
- BALMER, S.E., WHARTON, B.A. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. **Arch. Dis. Child.**, v.64, p.1672-1677, 1989.
- BEACHEY, E.H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **J. Infect. Dis.**, v.143, p.325-425, 1981.
- BEERENS, H., ROMOND, C., NEUT, C. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.2434-2439, 1980.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p.2-7, 1998.
- BEZKOROVAINY, A. Human milk and colostrum proteins: a review. **J. Dairy Science**, v.19, p.1023-1037, 1977.
- BEZKOROVAINY, A., NICHOLS, JH. Glycoproteins from mature human milk whey. **Pediat. Res.**, v.10, p.1-5, 1976.
- BEZKOROVAINY, A., MILLER-CATCHPOLE, R., KOT, E. Health benefits of bifidobacteria. **Tecnol. Lac. Latinoam.**, v.10, p.34-41, 1997.
- BIAVATI B, SGORBATI B., SCARDOVI V. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.32. p.358-373. 1982.
- BIAVATI, B., SGORBATI, B., SCARDOVI, V. The genus *Bifidobacterium*. In: **The Prokaryotes**. 2<sup>nd</sup>. Ed. A BALOWS, H. G. TRUPER, M. DWORKIN, W. HARDER, K. H. SCHEIFER, v.2, p.816-833. 1992.
- BIBILONI, R., PÉREZ, P.F., De ANTONI, G.L.. Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture. **Anaerobe**, v.5, p.483-485, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição- INAN. Secretaria de Programas Especiais-SPE. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno-PNIAM. **Normas Gerais para Bancos de Leite Humano**. Brasília, DF, 1993. 20p.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição-INAN. Secretaria de Programas Especiais-SPE. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno-PNIAM. **Manual de Rotinas em Bancos de Leite Humano**. Ministério da Saúde. Brasília, D.F.,1994.
- BRASSART, D., SCHIFFRIN, E.J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends Food Sci. Technol.**, v.8, p.321-26, 1997.
- BUTS, J.P. Polyamines in milk. **Annales Nestlé** ., v.54, p.98-104, 1996.
- CARVER, J.D. Nucleotides in milk. **Annales Nestlé** , v.54, p.88-97, 1996.
- CATTO-SMITH, A.G. Gut flora and mucosal function. **Asia Pacific. J. Clin. Nutr.**, v.5, p.36-39, 1996.
- COLLINS, M.D., GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p.1052S-1057S, 1999.
- COLOMBEL, J.F., CORTOT, A., NEUT, C., ROMOND, C. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. **Lancet**, v.2, n.1, p.43-46, 1987.
- COPPA, G.V., GABRIELLI, O., PIERANI, P., CATASSI, C., CARLUCCI, A. and GIORGI, P.L. Changes in Carbohydrate Composition in Human Milk Over 4 Months of Lactation. **Pediatrics**, v.91, p.637-641. 1993.
- COSTA, R.S., CARMO, M.G.T. Efeito da pasteurização sobre os níveis de oligoelementos de colostros de puérperas no Rio de Janeiro, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 8, 2000, Recife. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000.
- CRAVIOTO A., TELLO A., VILLAFÁN H., RUIZ J., VEDOVO S., NEESER J.R. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fraction of human colostrum and breast milk. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.1247-1255, 1991.
- CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **J. Appl. Bacteriol.**, v.70, p.443-459, 1991.
- DEWEY, K.G., HEINIG, J., NOMMSEN-RIVERS, L.A. Differences in morbidity between breast-feed and formula-fed infants. **J. Pediatrics**, v.126, p.696-702, 1995.

DUBEY, U.K., MISTRY, V.V. Growth characteristics of Bifidobacteria in infant formulas. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.1146-1155, 1996.

ELWING, E. **Características físico-químicas e imunológicas de leite humano e estudos que visam sua preservação em bancos de leite.** Viçosa, MG: UFV 1988. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.

FALK, P.G., HOOPER, L.V., MIDVEDT, T., GORDON, J.I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from Gnotobiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1157-70. 1998.

FOMON, S.J. Human milk and breast feeding. In: **Nutrition of Normal Infants.** St. Louis: Mosby, 1993. p.409-423.

FORD, J.E., LAW, B.A., MARSHALL, V.M.E. REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some its protective constituents. **J. Pediatr.**, v.90 p.29-35, 1977.

FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Acad. Prof., 1998. 478p.

FRANKE, A.A., CUSTER, L.J., TANAKA, Y. Isoflavones in human milk and other biological fluids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1466S-1473S, 1998. Suppl.

FRANSSON, G-B., LÖNNERDAL, B. Zinc, copper, calcium e magnesium in human milk. **J. Pediatr.**, v.101, p.504-508, 1982.

FRETER, R. Factors affecting the microecology of the gut. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics** – the Scientific Basis. New York: Chapman and Hall, 1992. p.111-144.

FUJIWARA, S., HASHIBA, H., HIROTA, T., FORSTNER, J.F. Proteinaceous factor(s) in culture fluids of Bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.506-512, 1997.

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

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v.32, p.439-442, 1991.

GEBRE-MEDHIN, M., VAHLQUIST, A., HOFVANDER, Y., UPPSÅLL, L., VAHLQUIST, B.B. Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.29, p.441-451, 1976.

- GIBSON, G.R., WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, v.77, p.412-20, 1994.
- GIBSON, G.R., ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, p.1401-1412, 1995.
- GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potencial benefits for humans. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2483-2494, 1989.
- GOTHERFORS, G. Effects of diet on intestinal flora. **Acta Paediatr. Scand.**, v.351, p.118S-121S, 1988. Suppl.
- HAMES, B.D., RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins: A practical approach**. 2 ed. Oxford: IRL Press. 1994. 383p.
- HANSON, L.A., DAHLMAN-HÖGLUND, A., KARLSSON, M., LUNDIN, S., DAHLGREN, U., TELEMO, E. A flora microbiana normal do intestino e o sistema imune. In: Ed. Hanson, L.A., YOLKEN, R.H. (Ed.) **Vevey: Nestec Ltd.**, 1998. p.29-31. (Nestlé Nutrition Workshop Series).
- HASCHE, F. Bb12: a *Bifidobacterium* that protects children. In: **Nutrition-Health and Well-being**. Nutrition health and well-being. Nestec Ltd. 1999. 45p.
- HASSINEN, J.B., DURBIN, G.T., TOMARELLI, R.M., BERNHART, F.W. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. **J. Bacteriol.**, v.62, p.771-777, 1951.
- HATHEWAY, C.L., Toxigenic clostridia. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, p.66-98. 1990.
- HAVENAAR, R., BRINK, B.T., HUIS IN'T VELD, J.H.J., Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics-The scientific basis**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.209-224.
- HAUSCHILD, A.H.W., HILSHEIMER, R., WEISS, K.F., BURKE, R.B., *Clostridium botulinum* in honey, syrups, and dry infant cereals. **J. Food Prot.**, v.51, p.892-894. 1988.
- HOOVER, D.G. Bifidobacteria: activity and potential benefits. **Food Tech.**, v.6, p.120-124, 1993.
- IBRAHIM, A.S., BEZKOROVAINY, A.V. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. **J. Food Prot.**, v.56, n.8, p.713-715, 1993.

- IDOTA, T., KAWAKAMI, H., NAKAJIMA I. Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances on Bifidobacteria. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.58, p.1720-1722, 1994.
- KELLY, D., COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science.**, v.66, p.161-167, 2000.
- KIRAJAVAINEN, P.V., OUWEHAND, A.C., ISOLAURI, E., SALMINEN, S.J. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.67, p.185-189, 1998.
- KOBATA, A., GINSBURG, V. Oligosaccharides of human milk. **Arch. Bioch. Bioph.**, v.130, p. 509-513, 1969.
- KOK, R.G., DE WAAL, A., SCHUT, F., WELLING, G.W., WEENK, G., HELLINGWERF, G.W. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.3668-3672, 1996.
- KOLDOVSKY, O. Hormones and growth factors in milk. **Annales Nestlé.**, v.54, p.105-112, 1996.
- KOLETZKO, B., AGGETT, P.J., BINDELS, J.G., BUNG, P. FERRÉ, P., GIL, A., LENTZE, M.J., ROBERFROID, M., STROBEL, S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **Brit. J. Nutr.**, v.80, p.S5-S45. 1998. Suppl.
- KOT, E., FURMANOV, S., BEZKOROVAINY, A. Accumulation of iron in acid lactic bacteria and Bifidobacteria. **J. Food Sci.**, v.60, p.547-550, 1995.
- LANGHENDRIES, J.P., DETRY, J., VAN HEES, J.V., LAMBORAY, J.M., DARIMONT, J., MOZIN, M.J., SECRETIN, M.C., SENTERRE, J. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.21, p.177-181, 1995.
- LARSON, B.L., ROLLERI, G.D. Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. **J. Dairy Sci.**, v.31, p.351-360, 1954.
- LIEBHABER. M., LEWISTON, N.J., ASQUITH, M.T., SUNSHINE, P. Comparison of bacterial contamination with two methods of human milk collection. **J. Pediatr.**, v.92, p.236-237, 1978.

- 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. **J. Food Prot.**, v.51, p.467-470, 1988.
- LÖNNERDAL, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.42, p.1299-1317, 1985.
- LÖNNERDAL, B. Lactoferrin in milk. **Annales Nestlé**., v.54, p.79-87, 1996.
- LÖNNERDAL, B., HOFFMAN, B., HURLEY, L.S. Zinc and copper binding proteins in human milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.36, p.1170-1176, 1982.
- LÖNNERDAL B., FORSUM, E. Casein content of human milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.41, p.113-120, 1985.
- LUCAS, A., ROBERTS, C.D. Bacteriological quality control in human milk-banking. **Brit. Med. J.**, v.1, p.80-82, 1979.
- LUNDEQUIST, B., NORD, C.E., WINBERG, J. The composition of the faecal flora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. **Acta Paediatr. Scand.**, v.74, p.45-51, 1985.
- McCARTNEY, A.L., WENZHI, W., TANNOCK, G.W. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.4608-4613, 1996.
- MACKIE, R.I., SGHIR, A., GASKINS, H.R. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p.1035S-1045S, 1999. Suppl.
- MANSON, W.G., WEAVER, L.T. Fat digestion in the neonate. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal.**, v.76, p.F206-F211, 1997.
- MAY, J.T.. Microbial contaminants and antimicrobial properties of human milk. **Microbiol. Sci.**, v.5, p.42-46, 1988.
- MELACHOURIS, N.P., TUCKEY, S.L. Denaturation of whey protein in milk heated at high temperatures for short times. **J. Dairy Sci.**, v.49, p.1154-1156, 1966.
- MERCK. **Microbiology Manual**. Darmstadt: E. Merck. 1992. 343p.
- MIDURA, T.F., ARNON, S.S., Infant botulism: identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in faeces. **Lancet.**, v.2, p.934-936, 1976.

- MILLER-CATCHPOLE, R., KOT, E., HALOFTIS, G., FURMANOV, S., BEZKOROVAINY, A. V. Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. **Nutr. Research.**, v.17, n.2, p.205-213, 1997.
- MITSUOKA, T. Ecology of the bifidobacteria. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.30, p.1799-1810, 1977.
- MITSUOKA, T. **Intestinal bacteria and health**. Tokyo: Harcourt Brace Jovarnovich Japan. 1978. 208p.
- MITSUOKA, T. **Microbes in the intestine** – our lifelong partners. Tokyo: Yakult Honsha Co., Ltd., 1989. 104p.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v.1, p.2-9, 1996.
- MORINAGA MILK INDUSTRIES CO., Ltd. **Physiological effects of *Bifidobacterium longum* BB536**—*in vitro* tests and administration to human and animals. p.1-15. July. 1995.
- NAGASAWA, T., KIYOSAWA, I, KUWAHARA, K. Human casein. II Isolation of Human  $\beta$ -casein fraction and human  $\beta$ -casein B. **J. Dairy Sci.**, v.53, p.136-145, 1969.
- NAIL, P.A., THOMAS, M.R., EAKIN, R. The effect of thiamin and riboflavin supplementation on the level of those vitamins in human breast milk and urine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.198-204, 1980.
- NARAYANAN, I, GUPTA, J. Human milk and neonatal infections. **Acta Paediatr. Scand.**, v.351, p.126-130, 1989.
- NEWBURG, D.S. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? **J. Nutr.**, v.127, 980S-984S, 1997. Suppl.
- NEWBURG, D.S., STREET, J.M. Bioactive materials in human milk. **Nutr. Today**, v.32, p.191-201, 1997.
- NEWBURG, D.S. & STREET, J.M. YOLKEN et al., 1992. In: NEWBURG, D.S., STREET, J.M. Bioactive materials in human milk. **Nutr. Today**, v.32, p.191-201, 1997.
- NÓBREGA, FJ. **Human Milk Composition**. São Paulo: Revinter. 1996. 236p.

- NORRIS, R.F., FLANDERS, T., TOMARELLI, R.M., GYÖRGY, P. The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*: a comparison of branched and unbranched strains. **J. Bacteriol.**, v.60, p.681-696, 1950.
- NOVAK F.R., ALMEIDA, J.A.G., WARNKEN, M.B., FERREIRA-CARVALHO, B.T., HAGLER, A.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.95, p.29-33, 2000.
- PARDOU, A., SERRUYS, E., MASCART-LEMONE, F., DRAMAIX, M., VIS, H.L. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. **Biol. Neonate.**, v.65, p.302-309, 1994.
- PARRET, A.M., EDWARDS, C.A. In vitro fermentation of carbohydrate by breast fed and formula fed infants. **Arch. Dis. Child.**, v.76, p.249-253, 1997.
- PERDIGÓN, G., ALVARÉZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics**-The scientific basis. New York: Chapman and Hall, 1992. p.145-180.
- PÉREZ, P.F., MINNAARD, J., DISALVO, E.A., De ANTONI, G.L. Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.21-26. 1998.
- PETSCHOW, B.W., TALBOTT, R.D. Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.287-292, 1990.
- PETSCHOW, B.W., TALBOTT, R.D. Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. **Pediat. Research.**, v.29, p.208-213, 1991.
- PITKIN, R.M., HAMOSH M. In: PITKIN, R.M., HAMOSH, M. (Ed.) **Nutrition during lactation**. Washington, DC: National Acad. Press. 1991. p.1-19.
- POUPARD, J.A., HUSAIN, I., NORRIS, R.F. Biology of the Bifidobacteria. **Bacteriology Reviews.**, v.37, n.2, p.136-165, 1973.
- RAJALAKSHMI, K., SRIKANTIA, S.G. Copper, zinc, and magnesium content of breast milk of Indian women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.664-669, 1980.
- RAPTOPOULOS-GIGI, M., MARWICK, K, McCLELLAND, D.B.L. Antimicrobial proteins in sterilised human milk. **Brit. Med. J.**, v.1, p.12-14, 1977.
- REA, M.F., TOMA, T.S. Proteção do leite materno e ética. **Rev. Saúde Pública.**, v.34, n.4, p.388-395, 2000.

- RUBALTELLI, F.F., BIADAIOLI, R., PECILE, P., NICOLETTI, P. Intestinal flora in breast-and bottle-fed infants. **J. Perinat. Med.**, v.26, p.186-191, 1998.
- SAAVEDRA, J.M., BAUMAN, N.A., OUNG, I., PERMAN, J.A., YOLKEN, R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **Lancet**, v.344, p.1046-1049, 1994.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E. Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. **Asia Pacific. J. Clin. Nutr.**, v.5, p.53-65, 1996.
- SALMINEN, S., BOULEY, C., BOUTRON-ROUULT, M.-C., CUMMINGS, J.H., FRANCK, A., GIBSON, G.R., ISOLAURI, E., MOREAU, M.-C., ROBERFROID, M., ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Brit. J. Nutr.**, v.80, p.S147-S171, 1998. Suppl.
- SANDBERG, D.P., BEGLEY, J.A., HALL, C.A. The content, binding, and forms of vitamin B<sub>12</sub> in milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.34, p.1717-1724, 1981.
- SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9 ed. v.2, p.1418-1434, 1986.
- SCHANLER, R.J. Overview the clinical perspective. **J. Nutr.**, v.130, p.417S-419S, 2000. Suppl.
- SCHAUER, D.B. Indigenous microflora: paving the way for pathogens? **Cur. Biol.**, v.7, p.R75-R77, 1997.
- SHAHANI, K.M., KWAN, A.J., FRIEND, B.A. Role and significance of enzymes in human milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.1861-1868, 1980.
- SONG W.O., CHAN, G.M., WYSE, B.W., HANSEN, R.G. Effect of pantothenic acid status on the content of the vitamin in human milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.40, p.317-324, 1984.
- SOOD, S.M., SIDHU, K.S. Heat stability and the voluminosity and hydration of casein micelles from milks of different species. **New Zealand Dairy Sci. Technol.**, v.14, p.217-225, 1979.
- SPIKA, J.S., SHAFFER, N., HARGRETT-BEAN, N., COLLIN, S., MACDONALD, K.L., BLAKE, P.A., Risk factors for infant botulism in the United States. **Am. J. Dis. Child.**, v.143, p.828-832. 1989.

- TAMIME, A.Y., MARSHALL, V.M.E., ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Research.**, v.62, p.151-187, 1995.
- TANNOCK, G.W. In: TANNOCK, G.W. (Ed.) **Probiotics** – a critical review. England: Horizon Scientific Press. 1999. 161p.
- TANNOCK, G.W., FULLER, R., SMITH, S.L., HALL, M.A. Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.1225-1228, 1990.
- TAYLOR, A. Violations of the international code of marketing of breast milk substitutes: prevalence in four countries. **British Med. J.**, v.316, p.1117-1122, 1998.
- VICTORA C.G., HUTLEY, S.R., FUCHS, S.C., NOBRE, L.C., BARROS, F.C. Deaths due to dysentery, acute and persistent diarrhea among Brazilian infants. **Acta Paediatr.**, v.2, p.S7-S11, 1992.
- VIVERGE, D., GRIMMONPREZ, L., CASSANAS, G., BARDET, L., SOLERE, M. Variations in oligosaccharides and lactose in human milk during the first week of lactation. **J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.**, v.11, p.361-364, 1990a.
- VIVERGE, D., GRIMMONPREZ, L., CASSANAS, G., BARDET, L., OLERE, M. Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. **J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.**, v.11, p.365-370, 1990b.
- WEAVER, L.T., ARTHUR, H.M.L., BUNN, J.E.G., THOMAS, J.E. Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. **Arch. Dis. Child.**, v.78, p.235-39, 1998.
- WELLS, C.L, SUGIYAMA, H., BLAND, S.E., Resistance of mice with limited intestinal flora to enteric colonization by *Clostridium botulinum*. **J. Infect. Dis.**, v.146, p.791-796. 1982.
- WEST, P.A., HEWITT, J.H., MURPHY, O.M. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. **J. Appl. Bacteriol.**, v.46, p.269-277, 1979.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes**. Geneva, 1981. 24p.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protecting, promoting and supporting breast-feeding: the special role of maternity services.** Geneva, 1989. 32p.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION **Global Data Bank on Breast-Feeding. Breast-feeding: the best start in life.** Nutrition Unit. Geneva, 1996. 10p.

WHO-**Nutrition Database System.** Geneva, 1999. 37p.

WHITNEY, E.N., ROLFES, S.R. **Infancy, Childhood, and Adolescence.** In: Understanding Nutrition. 1996. 757p.

WILLIAMS, A.F., FISHER, C., GREASLEY, V., TRAYLER, H., WOOLRIDGE, M.W. PHIL, D., BAUM, J.D. Human milk banking. **J. Trop. Ped.**, v.31, p.185-190, 1985.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A

Quadro 1A - Grupos microbianos presentes em leite humano coletado por expressão manual (UFC/mL)

Amostr a	VRB*	KEA	RCA	PCA	PDA
A3	1,00.10 <sup>1</sup>	1,67.10 <sup>2</sup>	2,00.10 <sup>2</sup>	2,06.10 <sup>2</sup>	1,77.10 <sup>2</sup>
A4	4,50.10 <sup>0</sup>	7,00.10 <sup>0</sup>	6,80.10 <sup>1</sup>	6,70.10 <sup>1</sup>	2,50.10 <sup>1</sup>
A5	2,50.10 <sup>0</sup>	3,45.10 <sup>1</sup>	1,12.10 <sup>2</sup>	6,55.10 <sup>1</sup>	-
A6	0	9,55.10 <sup>1</sup>	1,54.10 <sup>1</sup>	2,18.10 <sup>2</sup>	4,00.10 <sup>0</sup>
A7	0	1,40.10 <sup>1</sup>	1,24.10 <sup>2</sup>	4,60.10 <sup>1</sup>	1,00.10 <sup>0</sup>
A8	6,50.10 <sup>0</sup>	2,00.10 <sup>0</sup>	5,70.10 <sup>1</sup>	4,15.10 <sup>1</sup>	3,00.10 <sup>0</sup>
A9	0	0	2,10.10 <sup>1</sup>	1,64.10 <sup>2</sup>	0,50.10 <sup>0</sup>
A10	0	3,05.10 <sup>1</sup>	1,00.10 <sup>0</sup>	4,00.10 <sup>0</sup>	5,00.10 <sup>0</sup>
M2	3,00.10 <sup>0</sup>	1,82.10 <sup>4</sup>	2,47.10 <sup>2</sup>	2,48.10 <sup>2</sup>	3,50.10 <sup>0</sup>
M4	0	5,15.10 <sup>2</sup>	7,75.10 <sup>1</sup>	8,95.10 <sup>1</sup>	7,50.10 <sup>0</sup>
I1	0	1,39.10 <sup>2</sup>	3,35.10 <sup>1</sup>	2,90.10 <sup>2</sup>	2,80.10 <sup>2</sup>
$\bar{x} \pm \sigma$	2,40.10 <sup>0</sup> ( $\pm 3,38.10^0$ )	1,74.10 <sup>3</sup> ( $\pm 5,46.10^3$ )	8,72.10 <sup>1</sup> ( $\pm 7,48.10^1$ )	1,31.10 <sup>2</sup> ( $\pm 9,73.10^1$ )	5,07.10 <sup>1</sup> ( $\pm 9,71.10^1$ )

\* Meios de cultura: VRB - violeta vermelho brilhante; KEA - azida esculina canamicina; RCARCA - ágar reforçado para clostrídios; PCA - ágar-padrão para contagem; PDA - ágar batata dextrose.

Quadro 2A - Grupos microbianos presentes em leite humano coletado com bomba manual (UFC/mL)

Amostr a	VRB*	KEA	RCA	PCA	PDA
C1	0,50.10 <sup>0</sup>	7,95.10 <sup>1</sup>	1,28.10 <sup>2</sup>	1,38.10 <sup>2</sup>	2,90.10 <sup>1</sup>
M1	6,00.10 <sup>1</sup>	4,85.10 <sup>1</sup>	6,50.10 <sup>1</sup>	6,10.10 <sup>1</sup>	5,25.10 <sup>1</sup>
M3	4,45.10 <sup>1</sup>	4,05.10 <sup>1</sup>	7,05.10 <sup>1</sup>	2,15.10 <sup>2</sup>	1,92.10 <sup>2</sup>
H1	0	8,30.10 <sup>1</sup>	1,32.10 <sup>2</sup>	1,73.10 <sup>2</sup>	1,24.10 <sup>2</sup>
$\bar{x} \pm \sigma$	2,62.10 <sup>1</sup> ( $\pm 3,07.10^1$ )	6,29.10 <sup>1</sup> ( $\pm 2,15.10^1$ )	9,89.10 <sup>1</sup> ( $\pm 3,60.10^1$ )	1,47.10 <sup>2</sup> ( $\pm 6,53.10^2$ )	9,94.10 <sup>1</sup> ( $\pm 7,38.10^1$ )

\* Meios de cultura: VRB - violeta vermelho brilhante; KEA - azida esculina canamicina; RCA - ágar reforçado para clostrídios; PCA - ágar-padrão para contagem; PDA - ágar batata dextrose.

Quadro 3A - Grupos microbianos presentes em leite humano coletado no gotejamento da mama (UFC/mL)

Amostr a	VRB*	KEA	RCA	PCA	PDA
C2	0	$3,10.10^1$	$5,50.10^0$	$2,50.10^0$	$4,50.10^0$
C3	$1,13.10^2$	$1,60.10^2$	$1,38.10^2$	$6,40.10^1$	$7,25.10^1$
C4	0	$6,50.10^1$	$8,45.10^1$	$2,30.10^1$	$1,40.10^1$
C5	0	$7,75.10^1$	$1,34.10^2$	$2,39.10^2$	$5,30.10^1$
$\bar{x} \pm \sigma$	$2,82.10^1$ ( $\pm 5,65.10^1$ )	$8,34.10^1$ ( $\pm 5,47.10^1$ )	$9,05.10^1$ ( $\pm 6,17.10^1$ )	$8,21.10^1$ ( $\pm 1,08.10^2$ )	$3,60.10^1$ ( $\pm 3,21.10^1$ )

\* Meios de cultura: VRB - violeta vermelho brilhante; KEA - azida esculina canamicina; RCA - ágar reforçado para clostrídios; PCA - ágar-padrão para contagem; PDA - ágar batata dextrose.

Quadro 4A - Grupos microbianos presentes em leite humano obtido por diferentes técnicas de coleta (Log UFC/mL  $\pm$  desvio-padrão)

Meio de Cultivo	Expressão manual <sup>1</sup>	Bomba manual <sup>2</sup>	Gotejamento <sup>3</sup>
VRB*	$0,38 \pm 0,53$	$1,42 \pm 1,49$	$1,45 \pm 1,75$
KEA	$3,24 \pm 3,74$	$1,80 \pm 1,33$	$1,92 \pm 1,74$
RCA	$1,94 \pm 1,89$	$2,00 \pm 1,56$	$1,96 \pm 1,79$
PCA	$2,12 \pm 1,99$	$2,17 \pm 2,81$	$1,91 \pm 2,03$
PDA	$1,71 \pm 1,99$	$2,00 \pm 1,87$	$1,56 \pm 1,49$

\* Meios de cultura: VRB - violeta vermelho brilhante; KEA - azida esculina canamicina; RCA - ágar reforçado para clostrídios; PCA - ágar-padrão para contagem; PDA - ágar batata dextrose.

1: n = 11; 2: n = 4; 3: n = 4.

Quadro 5A - Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	6,03.10 <sup>6</sup>	0,44	0,50
		24	1,65.10 <sup>7</sup>		
	2	0	1,98.10 <sup>7</sup>	0,36	
		24	4,43.10 <sup>7</sup>		
	3	0	5,23.10 <sup>6</sup>	0,71	
		24	2,71.10 <sup>7</sup>		
FLP	1	0	7,60.10 <sup>6</sup>	-0,43	-0,40
		24	2,83.10 <sup>6</sup>		
	2	0	1,49.10 <sup>7</sup>	-0,29	
		24	7,50.10 <sup>6</sup>		
	3	0	5,97.10 <sup>6</sup>	-0,48	
		24	2,00.10 <sup>6</sup>		

Quadro 6A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

Tratamento	Repetição	UFC/mL	Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de
------------	-----------	--------	--------------------------------------	----------

		(incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	
FLNP	1	0	9,15.10 <sup>6</sup>	0,34	0,45
		24	2,01.10 <sup>7</sup>		
	2	0	1,68.10 <sup>7</sup>	0,52	
	24	5,48.10 <sup>7</sup>			
	3	0	9,22.10 <sup>6</sup>	0,50	
		24	2,88.10 <sup>7</sup>		
FLP	1	0	9,33.10 <sup>6</sup>	-0,50	
		24	2,97.10 <sup>6</sup>		
	2	0	2,38.10 <sup>7</sup>	-0,37	
	24	1,02.10 <sup>7</sup>			
	3	0	8,23.10 <sup>6</sup>	-0,20	
		24	5,57.10 <sup>6</sup>		

Quadro 7A - Crescimento de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	8,88.10 <sup>6</sup>	0,31	0,38
		24	1,80.10 <sup>7</sup>		
	2	0	6,85.10 <sup>6</sup>	0,42	
	24	1,80.10 <sup>7</sup>			
	3	0	8,03.10 <sup>6</sup>	0,42	
		24	2,13.10 <sup>7</sup>		
FLP	1	0	8,50.10 <sup>6</sup>	-0,27	
		24	4,52.10 <sup>6</sup>		
	2	0	6,07.10 <sup>6</sup>	-0,41	
	24	2,33.10 <sup>6</sup>			
	3	0	8,12.10 <sup>6</sup>	-0,25	
		24	4,51.10 <sup>6</sup>		

Quadro 8A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	7,92.10 <sup>6</sup>	0,38	0,52
		24	1,89.10 <sup>7</sup>		
	2	0	7,13.10 <sup>6</sup>	0,71	
		24	3,67.10 <sup>7</sup>		
	3	0	5,61.10 <sup>6</sup>	0,48	
		24	1,70.10 <sup>6</sup>		
FLP	1	0	7,57.10 <sup>6</sup>	-0,60	-0,45
		24	1,92.10 <sup>6</sup>		
	2	0	6,72.10 <sup>6</sup>	-0,41	
		24	2,66.10 <sup>6</sup>		
	3	0	4,97.10 <sup>6</sup>	-0,35	
		24	2,23.10 <sup>6</sup>		

Quadro 9A - Análise de Variância – Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP) ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP)

Cultura	FV	GL	SQ	QM	F
ATCC 29521	Tratament o	1	1,218124	1,218124	54,52 7
	Resíduo	4	0,8935857	0,2233964	
ATCC 15700	Tratament o	1	0,3194985	0,3194985	1,338
	Resíduo	4	0,9552459	0,2388115	
ATCC 15707	Tratament o	1	1,596129	1,596129	8,275
	Resíduo	4	0,7715423	0,1928856	
AJ 32	Tratament o	1	1,415754	1,415754	61,77 7

Resíduo	4	0,0916686 1	0,0229171 5	7
---------	---	----------------	----------------	---

Quadro 10A - Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de (N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	8,50.10 <sup>6</sup>	0,28	0,33
		24	1,62.10 <sup>7</sup>		
	2	0	6,65.10 <sup>6</sup>	0,38	
		24	1,59.10 <sup>7</sup>		
	3	0	2,75.10 <sup>7</sup>	0,33	
		24	5,85.10 <sup>7</sup>		
FLP	1	0	8,65.10 <sup>6</sup>	-0,61	-0,43
		24	2,12.10 <sup>6</sup>		
	2	0	7,10.10 <sup>6</sup>	-0,60	
		24	1,79.10 <sup>6</sup>		
	3	0	3,95.10 <sup>7</sup>	-0,08	
		24	3,30.10 <sup>7</sup>		
LPi	1	0	9,40.10 <sup>6</sup>	-0,72	-0,51
		24	1,78.10 <sup>6</sup>		
	2	0	6,80.10 <sup>6</sup>	-0,65	
		24	1,51.10 <sup>6</sup>		
	3	0	4,15.10 <sup>7</sup>	-0,17	
		24	2,80.10 <sup>7</sup>		

Quadro 11A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de (N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	7,60.10 <sup>6</sup>	0,23	0,21
		24	1,30.10 <sup>7</sup>		
	2	0	6,65.10 <sup>6</sup>	0,32	
		24	1,37.10 <sup>7</sup>		

	3	0 24	$6,50 \cdot 10^7$ $7,80 \cdot 10^7$	0,08	
FLP	1	0 24	$8,15 \cdot 10^6$ $1,87 \cdot 10^6$	-0,64	
	2	0 24	$7,05 \cdot 10^6$ $1,87 \cdot 10^6$	-0,58	-0,47
	3	0 24	$5,20 \cdot 10^7$ $3,30 \cdot 10^7$	-0,20	
LPi	1	0 24	$7,95 \cdot 10^6$ $1,60 \cdot 10^6$	-0,70	
	2	0 24	$7,30 \cdot 10^6$ $1,46 \cdot 10^6$	-0,70	-0,55
	3	0 24	$6,00 \cdot 10^7$ $3,45 \cdot 10^7$	-0,24	

Quadro 12A - Crescimento de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)	Log( $N_t/N_0$ )	Média de ( $N_t/N_0$ )
	1	0	$7,20 \cdot 10^6$	

		0	$7,20 \cdot 10^6$		
FLNP	2	<del>24</del>	<del><math>7,62 \cdot 10^6</math></del>	<del>0,14</del>	0,14
		24	$1,23 \cdot 10^7$	0,21	
	3	0	$8,25 \cdot 10^7$	0,08	
		24	$1,00 \cdot 10^8$		
FLP	1	0	$7,70 \cdot 10^6$	-0,64	
		24	$1,78 \cdot 10^6$		
	2	0	$6,70 \cdot 10^6$	-0,61	-0,47
		24	$1,68 \cdot 10^6$		
LPi	3	0	$7,30 \cdot 10^7$	-0,17	
		24	$4,90 \cdot 10^7$		
	1	0	$7,70 \cdot 10^6$	-0,69	
		24	$1,60 \cdot 10^6$		
LPi		0	$6,40 \cdot 10^6$		-0,50
		24	$1,36 \cdot 10^6$		
			0	$7,50 \cdot 10^7$	
		24	$5,55 \cdot 10^7$		

Quadro 13A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de (N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	7,95.10 <sup>6</sup>	0,10	0,36
		24	1,00.10 <sup>7</sup>		
	2	0	7,70.10 <sup>6</sup>	0,15	
		24	1,09.10 <sup>7</sup>		
	3	0	3,50.10 <sup>7</sup>	0,84	
		24	2,41.10 <sup>8</sup>		
FLP	1	0	8,00.10 <sup>6</sup>	-0,63	-0,47
		24	1,87.10 <sup>6</sup>		
	2	0	6,95.10 <sup>6</sup>	-0,64	
		24	1,59.10 <sup>7</sup>		
	3	0	2,80.10 <sup>7</sup>	-0,14	
		24	2,05.10 <sup>7</sup>		
LPi	1	0	7,35.10 <sup>6</sup>	-0,70	-0,53
		24	1,49.10 <sup>6</sup>		
	2	0	6,70.10 <sup>6</sup>	-0,71	
		24	1,33.10 <sup>6</sup>		
	3	0	4,65.10 <sup>7</sup>	-0,18	
		24	3,10.10 <sup>7</sup>		

Quadro 14A - Análise de Variância - Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), e em leite humano pasteurizado integral (LPi)

Cultura	FV	GL	SQ	QM	F
ATCC 29521	Tratament	2	1,300584	0,6502921	10,415
	o Resíduo	6	0,3746262	0,06243769	
ATCC 15700	Tratament	2	1,036002	0,5180010	11,018
	o Resíduo	6	0,2820799	0,04701332	
ATCC 15707	Tratament	2	0,8307689	0,4153845	7,3
	o Resíduo	6	0,3414067	0,05690112	

AJ 32	Tratament o	2	0,481223	0,7406113	6,455
	Resíduo	6	0,6883618	0,1147270	

Nível de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Quadro 15A - Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log( $N_t/N_0$ )	Média de ( $N_t/N_0$ )
FLNP	1	0	$1,79 \cdot 10^7$	0,22	0,41
		24	$2,93 \cdot 10^7$		
	2	0	$8,90 \cdot 10^6$	0,44	
		24	$2,47 \cdot 10^7$		
	3	0	$1,04 \cdot 10^7$	0,56	
		24	$3,78 \cdot 10^7$		
FLP	1	0	$1,29 \cdot 10^7$	-0,24	-0,16
		24	$7,40 \cdot 10^6$		
	2	0	$7,80 \cdot 10^6$	-0,11	
		24	$6,00 \cdot 10^6$		
	3	0	$1,19 \cdot 10^7$	-0,13	
		24	$8,95 \cdot 10^6$		
LPd	1	0	$1,32 \cdot 10^7$	-0,25	-0,14
		24	$7,45 \cdot 10^6$		
	2	0	$9,00 \cdot 10^6$	-0,14	
		24	$6,50 \cdot 10^6$		
	3	0	$1,06 \cdot 10^7$	-0,02	
		24	$1,01 \cdot 10^7$		
LPi	1	0	$1,50 \cdot 10^7$	-0,36	-0,27
		24	$6,60 \cdot 10^6$		
	2	0	$8,00 \cdot 10^6$	-0,29	
		24	$4,10 \cdot 10^5$		
	3	0	$1,75 \cdot 10^7$	-0,15	
		24	$1,23 \cdot 10^7$		

Quadro 16A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de (N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	1,37.10 <sup>7</sup>	1,35	0,75
		24	3,11.10 <sup>8</sup>		
	2	0	9,60.10 <sup>6</sup>	0,48	
24		2,88.10 <sup>7</sup>			
3	0	1,35.10 <sup>7</sup>	0,41		
	24	3,48.10 <sup>7</sup>			
FLP	1	0	1,54.10 <sup>7</sup>	-0,25	-0,16
		24	8,65.10 <sup>6</sup>		
	2	0	9,20.10 <sup>6</sup>	-0,12	
24		6,86.10 <sup>6</sup>			
3	0	1,42.10 <sup>7</sup>	-0,11		
	24	1,11.10 <sup>7</sup>			
LPd	1	0	1,48.10 <sup>7</sup>	-0,29	-0,17
		24	7,65.10 <sup>6</sup>		
	2	0	8,95.10 <sup>6</sup>	-0,10	
24		7,15.10 <sup>6</sup>			
3	0	1,30.10 <sup>7</sup>	-0,12		
	24	9,80.10 <sup>6</sup>			
LPi	1	0	1,37.10 <sup>7</sup>	-0,22	-0,17
		24	8,25.10 <sup>6</sup>		
	2	0	8,60.10 <sup>6</sup>	-0,14	
24		6,10.10 <sup>6</sup>			
3	0	1,40.10 <sup>7</sup>	-0,15		
	24	9,990.10 <sup>6</sup>			

Quadro 17A - Crescimento de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log(N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )	Média de (N <sub>f</sub> /N <sub>0</sub> )
FLNP	1	0	2,03.10 <sup>7</sup>	0,27	0,38
		24	3,76.10 <sup>7</sup>		
	2	0	9,70.10 <sup>6</sup>	0,54	
		24	3,38.10 <sup>7</sup>		
	3	0	1,70.10 <sup>7</sup>	0,33	
		24	3,60.10 <sup>7</sup>		
FLP	1	0	1,70.10 <sup>7</sup>	-0,26	-0,22
		24	9,40.10 <sup>6</sup>		
	2	0	9,55.10 <sup>6</sup>	-0,15	
		24	6,90.10 <sup>6</sup>		
	3	0	1,73.10 <sup>7</sup>	-0,24	
		24	9,95.10 <sup>6</sup>		
LPd	1	0	1,92.10 <sup>7</sup>	-0,14	-0,21
		24	1,39.10 <sup>7</sup>		
	2	0	9,80.10 <sup>6</sup>	-0,17	
		24	6,65.10 <sup>6</sup>		
	3	0	1,77.10 <sup>7</sup>	-0,32	
		24	8,45.10 <sup>6</sup>		
LPi	1	0	1,67.10 <sup>7</sup>	-0,32	-0,25
		24	8,00.10 <sup>6</sup>		
	2	0	9,85.10 <sup>6</sup>	-0,23	
		24	5,85.10 <sup>6</sup>		

3	0	$1,77 \cdot 10^7$	-0,20
	24	$1,13 \cdot 10^7$	

Quadro 18A - Crescimento de *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano integral pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano desnatado pasteurizado (LPd), e em leite humano integral pasteurizado (LPi)

Tratamento	Repetição	UFC/mL (incubação – h)		Log( $N_t/N_0$ )	Média de ( $N_t/N_0$ )
FLNP	1	0	$1,29 \cdot 10^7$	0,20	0,38
		24	$2,06 \cdot 10^7$		
	2	0	$7,90 \cdot 10^6$	0,49	
		24	$2,43 \cdot 10^7$		
	3	0	$1,07 \cdot 10^7$	0,44	
		24	$2,98 \cdot 10^7$		
FLP	1	0	$1,48 \cdot 10^7$	-0,26	-0,24
		24	$8,15 \cdot 10^6$		
	2	0	$7,30 \cdot 10^6$	-0,29	
		24	$3,70 \cdot 10^6$		
	3	0	$1,16 \cdot 10^7$	-0,17	
		24	$7,80 \cdot 10^6$		
LPd	1	0	$1,48 \cdot 10^7$	-0,25	-0,24
		24	$8,40 \cdot 10^6$		
	2	0	$7,30 \cdot 10^6$	-0,32	
		24	$3,50 \cdot 10^6$		
	3	0	$1,03 \cdot 10^7$	-0,15	
		24	$7,30 \cdot 10^6$		

	1	0	$1,56 \cdot 10^7$	-0,23	
		24	$9,20 \cdot 10^6$		
LPI	2	0	$7,55 \cdot 10^6$	-0,43	-0,25
		24	$5,75 \cdot 10^6$		
	3	0	$9,65 \cdot 10^6$	-0,10	
		24	$6,55 \cdot 10^6$		

Quadro 19A - Análise de Variância - Crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, e *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano pasteurizado adicionado do filtrado do leite humano não-pasteurizado (FLNP), ou do filtrado do leite humano pasteurizado (FLP), ou do leite humano pasteurizado desnatado LPd), e em leite humano pasteurizado integral (LPI)

Cultura	FV	GL	SQ	QM	F
<i>B. bifidum</i>	Tratamento	3	0,8205317	0,2735105	18,522
	Resíduo	8	0,1181338	0,14766673	
<i>B. breve</i>	Tratamento	3	1,888786	0,6295955	8,495
	Resíduo	8	0,5928917	0,7411146	
<i>B. longum</i>	Tratamento	3	0,8174570	0,2724857	28,291
	Resíduo	8	0,7705289	0,9631611	
<i>B. breve</i>	Tratamento	3	0,8090271	0,2696757	28,486
	Resíduo	8			

Quadro 20A - Viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem a -20°C (dias)	UFC/mL
1	0	1,80.10 <sup>8</sup>
	5	1,67.10 <sup>8</sup>
	10	1,60.10 <sup>8</sup>
	15	1,53.10 <sup>8</sup>
2	0	1,46.10 <sup>8</sup>
	5	1,37.10 <sup>8</sup>
	10	1,49.10 <sup>8</sup>
	15	1,37.10 <sup>8</sup>
3	0	1,61.10 <sup>8</sup>
	5	1,55.10 <sup>8</sup>
	10	1,59.10 <sup>8</sup>
	15	1,49.10 <sup>8</sup>

Quadro 21A - Viabilidade de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem a -20°C(dias)	UFC/mL
1	0	2,07.10 <sup>8</sup>
	5	1,90.10 <sup>8</sup>
	10	2,06.10 <sup>8</sup>
	15	1,82.10 <sup>8</sup>
2	0	2,59.10 <sup>8</sup>
	5	1,49.10 <sup>8</sup>
	10	1,47.10 <sup>8</sup>
	15	1,41.10 <sup>8</sup>
3	0	1,90.10 <sup>8</sup>
	5	1,73.10 <sup>8</sup>
	10	1,62.10 <sup>8</sup>
	15	1,49.10 <sup>8</sup>

Quadro 22A - Viabilidade de *Bifidobacterium longum* ATCC 15700 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem a -20°C(dias)	UFC/mL
1	0	1,78.10 <sup>8</sup>
	5	1,85.10 <sup>8</sup>
	10	2,00.10 <sup>8</sup>
	15	1,72.10 <sup>8</sup>
2	0	1,67.10 <sup>8</sup>
	5	1,45.10 <sup>8</sup>
	10	1,57.10 <sup>8</sup>
	15	1,47.10 <sup>8</sup>
3	0	1,85.10 <sup>8</sup>
	5	1,70.10 <sup>8</sup>
	10	1,65.10 <sup>8</sup>
	15	1,62.10 <sup>8</sup>

Quadro 23A - Viabilidade de *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano pasteurizado e congelado por 15 dias (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem a -20°C(dias)	UFC/mL
1	0	1,92.10 <sup>8</sup>
	5	1,76.10 <sup>8</sup>
	10	1,62.10 <sup>8</sup>
	15	1,78.10 <sup>8</sup>
2	0	1,77.10 <sup>8</sup>
	5	1,40.10 <sup>8</sup>
	10	1,53.10 <sup>8</sup>
	15	1,73.10 <sup>8</sup>
3	0	1,83.10 <sup>8</sup>

5	$1,84.10^8$
10	$1,97.10^8$
15	$1,70.10^8$

Quadro 24A - Viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem sob refrigeração (dias)	UFC/mL
1	0	$1,80.10^8$
	3	$1,67.10^8$
	6	$1,60.10^8$
	9	$1,53.10^8$
2	0	$1,46.10^8$
	3	$1,37.10^8$
	6	$1,49.10^8$
	9	$1,37.10^8$
3	0	$1,61.10^8$
	3	$1,55.10^8$
	6	$1,59.10^8$
	9	$1,49.10^8$

Quadro 25A - Viabilidade de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem sob refrigeração (dias)	UFC/mL
1	0	$2,07.10^8$
	3	$1,90.10^8$
	6	$2,06.10^8$
	9	$1,82.10^8$
2	0	$2,59.10^8$

	3	$1,49.10^8$
	6	$1,47.10^8$
	9	$1,41.10^8$
	0	$1,90.10^8$
3	3	$1,73.10^8$
	6	$1,62.10^8$
	9	$1,49.10^8$

Quadro 26A - Viabilidade de *Bifidobacterium longum* ATCC 15700 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem sob refrigeração (dias)	UFC/mL
	0	$1,78.10^8$
1	3	$1,85.10^8$
	6	$2,00.10^8$
	9	$1,72.10^8$
	0	$1,67.10^8$
2	3	$1,45.10^8$
	6	$1,57.10^8$
	9	$1,47.10^8$
	0	$1,85.10^8$
3	3	$1,70.10^8$
	6	$1,65.10^8$
	9	$1,62.10^8$

Quadro 27A - Viabilidade de *Bifidobacterium breve* AJ 32 em leite humano descongelado e refrigerado por 9 horas (média de três repetições)

Repetição	Tempo de estocagem sob refrigeração (dias)	UFC/mL
1	0	$1,92.10^8$

	3	$1,76.10^8$
	6	$1,62.10^8$
	9	$1,78.10^8$
	0	$1,77.10^8$
2	3	$1,40.10^8$
	6	$1,53.10^8$
	9	$1,73.10^8$
	0	$1,83.10^8$
3	3	$1,84.10^8$
	6	$1,97.10^8$
	9	$1,70.10^8$

Quadro 28A - Relação entre a viabilidade celular e tempo de congelamento para *Bifidobacterium* spp.

Microrganismo	Modelo ajustado
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	$Y = 1,54.10^8$
<i>B. breve</i> ATCC 15700	$Y = 1,80.10^8$
<i>B. longum</i> ATCC 15707	$Y = 1,69.10^8$
<i>B. breve</i> AJ32	$Y = 1,74.10^8$

Quadro 29A - Relação entre a viabilidade celular e tempo de refrigeração para *Bifidobacterium* spp.

Microrganismo	Modelo ajustado
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	$Y = 1,56.10^8$
<i>B. breve</i> ATCC 15700	$Y = 2,53.10^8$
<i>B. longum</i> ATCC 15707	$Y = 1,82.10^8$
<i>B. breve</i> AJ32	$Y = 2,37.10^8$



