Atividade antimicrobiana *in vitro* do colostro materno contra *streptococcus sanguis*

João Nilton Lopes de Sousa*
Carolina Bezerra Cavalcanti Nóbrega**
Renato Lopes de Sousa***

RESUMO – Avaliou-se a ação antimicrobiana do colostro contra *Streptococcus sanguis*. Dezoito cones de papel absorvente estéreis foram contaminados em 8 mL de BHI na escala 1 MacF durante 5min e imersos em 8 mL de colostro humano. Posteriormente, os cones foram imersos em BHI e incubados a 37ºC/48h. 0,1 mL obtido de cada tubo foram transferidos para 18 tubos de BHI, seguindo condições idênticas de incubação. Para o teste de difusão em ágar, 4 placas de petri de ágar Müeller-Hinton foram inoculadas com suspensão microbiana. Em cada placa usaram-se 6 discos de papel estéril para o colostro humano, 1 para àgua destilada e 1 para clorexidina a 2%. As placas foram incubadas a 37ºC por 48h e os resultados dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital. O colostro humano não apresentou ação antimicrobiana contra a bactéria. A clorexidina apresentou ação antimicrobiana com halo de inibição médio 14, 21 mm.

Palavras chaves: Colostro humano, atividade antimicrobiana e *Streptococcus sanguis*.

ABSTRACT - This research assessed, through two experimental methods, the antimicrobial action of maternal colostrum against *Streptococcus sanguis.* For the test of direct exposure, eighteen cones of sterile absorbent paper have been contaminated in 8ml of inoculum BHI in the scale 1 MacFarland for 5 minutes and, then, they have been immersed in 18 tubes containing sterile BHI. Then, the material have been incubated at 37º C for 48 hours. An inoculum of 0,1 ml obtained from each tube was placed to other 18 BHI tubes, regarding identical conditions of incubation. The increase of bacteria was assessed based on the turbidity of the environment. For the test of diffusion in agar, 4 plates petri of Müeller-Hinton agar (140 mm) were inoculated by rubbing with the swab, with microbial suspension, onto the agar's surface. In each plate, we used 6 dishes of sterile paper for human colostrum, 1 for distilled water and 1 for chlorhexidine at 2%. The plates were incubated at 37º C for 48 hours and the results of inhibition zones were measured with digital caliper rule. Human colostrum did not present antimicrobial action *in vitro*, through the test of agar diffusion and the method of direct exposure, against *Streptococcus sanguis.* Chlorhexidine at 2% (control) showed antimicrobial action, forming a medium inhibition zone of 14,21 mm.

Keywords: Human colostrum, antimicrobial activity, *Streptococcus sanguis.*

* Doutorando em Lazerterapia pala Universidade Cruzeiro do Sul- UNICSUL – São Paulo – SP; Mestre em Odontologia pala Universidade Potiguar – UnP- Natal – RN; Especialista em Periodontia pelo COESP – João Pessoa – PB; Professor do Departamento de Odontologia das faculdades Integradas de Patos – Fip – Patos – PB
** Graduando em Odontologia pelas Faculdades Integradas de Patos – FIP.
** Graduando em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba – UFCG.
E-mail: jnlopesodonto@gmail.com

INTRODUÇÃO

As propriedades anti-infecciosas do leite materno são bem conhecidas (OVALI et al., 2006). A criança é protegida contra infecções pelo aleitamento materno, demonstrando menor freqüência de doenças infecciosas em lactentes amamentados (ARAÚJO et al., 2005).

O colostro humano apresenta anticorpos dirigidos a inúmeros microrganismos com os quais a mãe entrou em contato durante toda a sua vida, representando de certa forma uma "memória" do seu repertório imunológico (HANSON, 1998). Predominam os anticorpos da classe IgA cuja principal ação é se ligar a microrganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies mucosas; prevenindo, assim, o contato de patógenos com o epitélio (BRANDTZAEG, 1995; LOUREIRO et al., 1998; SANCHES et al., 2000). Outras imunoglobulinas são encontradas no colostro e no leite humano em concentrações bem mais baixas do que IgA. Dentre elas, destacaram-se IgM, IgG, IgD e IgE (XANTHOU, 1998).

Além dos anticorpos, o colostro humano contém inúmeros fatores bioquímicos e células imunocompetentes, que interagem entre si e com a mucosa do trato digestivo e respiratório alto do recém-nascido, conferindo não apenas imunidade passiva, como também estímulo ao desenvolvimento e maturação do próprio sistema imune de mucosas do neonato (GOLDMAN, 1993)

A lactoferrina é uma glicoproteína presente no leite humano, com função de quelar íons férricos (Fe^{3+}) que são essenciais para a multiplicação de microrganismos patogênicos e que também pode se ligar diretamente a certos componentes da parede celular bacteriana como lipopolissacarídeo (LPS) e porinas (XANTHOU, 1998).

O colostro humano contém grande número de leucócitos viáveis, com predominância de fagócitos polimorfonucleares e mononucleares, incluindo numerosos macrófagos (Hanson, 1998). Os fagócitos presentes no colostro apresentam alta atividade fagocitária tanto para partículas como para microrganismos (CARBONARE et al., 1995; VASSÃO; CARNEIRO-SAMPAIO, 1989). Os fagócitos mononucleares do colostro humano apresentam receptores para fração Fc de IgG e IgA (CD89) e também para o componente C3 do complemento, o que favorece sua atividade fagocitária (VASSÃO e CARNEIRO-SAMPAIO, 1989; HONÓRIO-FRANÇA et al., 1997).

A microbiota bucal passa por várias alterações no decorrer da vida. Na fase intra-uterina, a boca é isenta de microrganismos. Os primeiros chegam na hora do nascimento e são transitórios, quando o parto é normal. São microrganismos vindos do canal vaginal da mãe, tais como estreptococos, lactobacilos, difteróides, coliformes, leveduras como *Candida*

albicans e alguns vírus e protozoários. A complexidade da microbiota bucal inicia-se com a erupção dos dentes, que propicia as condições necessárias para a instalação de bactérias que têm a capacidade de se fixar a ela, tais como *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis* (De Lorenzo, 2006). O *S. sanguis* é uma das pioneiras do biofilme dental, pois possui adesinas que reconhecem receptores específicos na superfície dental e na película adquirida (DE LORENZO; MAYER, 2004).

Por ser o colostro materno um alimento natural indispensável para a nutrição e para a imunidade do recém-nascido, protegendo o bebê contra infecções respiratórias e intestinais; como também uma substância socialmente acessível no seio materno e nos bancos de leite, este estudo teve como objetivo verificar a ação do colostro humano contra um tipo de microrganismo presente na cavidade bucal. Analisou-se a atividade antimicrobiana*, in vitro*, do colostro contra *Streptococcus sanguis* através do teste de difusão em ágar e pelo método de contato direto.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do colostro

O Colostro foi coletado no período compreendido entre 0 e 48 horas pós-parto por uma enfermeira responsável pelo banco de leite da Maternidade (Casa de Saúde e Maternidade Nossa Senhora da Conceição). Antes da ordenha, realizou-se a assepsia da mama com água e sabão e, posteriormente, massageou-se todo o seio, realizando o reconhecimento das estruturas mamárias (lobos, lóbulos e seios lactíferos) e das anormalidades. Excluíram-se as doadoras com alterações mamárias.

A coleta do colostro humano foi realizada manualmente em sala apropriada. Colocou-se sobre uma mesa da sala de ordenha um pano de campo esterilizado e sobre ele um recipiente estéril com a parte esterilizada da tampa para cima. Foram desprezados os primeiros jatos para reduzir contaminantes microbianos e assim melhorar a qualidade sanitária do leite humano ordenhado.

Após o término da ordenha, o recipiente foi identificado de acordo com os critérios de rotulagem utilizados na maternidade. Deste recipiente foi removido com uma pipeta esterilizada 20 mL de colostro doado pelo banco de leite e armazenado em recipiente esterilizado. Foi conservado em freezer até o transporte da amostra para o local da pesquisa,

que foi feito em caixa isotérmica revestida com PVC, contendo gelo reciclável. Antes dos testes antimicrobianos foi realizado um degelo prévio do colostro humano em banho-maria com água pré-aquecida a 37ºC por 30 min.

Microrganismos utilizados

Os microrganismos (*Streptococcus sanguis*) foram cultivados em meio de cultura sólido, Mueller Hinton (Himedia, Índia). Decorrido a incubação, à temperatura de 37ºC e 24 horas, células microbianas foram suspensas em caldo de BHI (Brain Heart Infusion) esterilizado em uma concentração de 3 x 10^8 células/mL ajustado a um tubo na escala 1 de MacFarland.

Teste de exposição direta

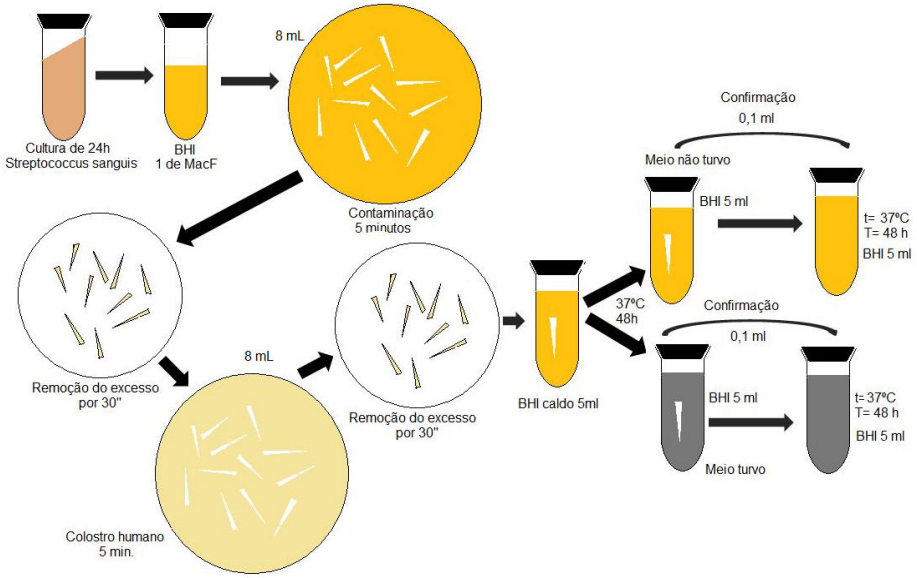
Dezoito cones de papel absorvente estéreis foram imersos em uma placa de Petri (140 mm), contendo 8 mL de caldo de BHI (Bacto^{TM}, USA) contaminado por *Streptococcus sanguis* na escala 1 MacFarland, durante 5 minutos. Depois deste período, removeram-se os cones de papel para uma placa vazia, afim de que fosse removido o excesso do inoculo. Em seguida, foram transferidos, todos de uma só vez, para outra placa de Petri (140 mm) contendo 8 mL de colostro humano, onde permaneceram por 5 minutos.

Decorrido o tempo de ação do colostro, os cones de papel absorvente, após a remoção do excesso, foram imersas em dezoito tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo de BHI estéril (Bacto^{TM}, USA) e, em seguida realizou-se a incubação a 37ºC por 48 horas. Após esse período, foi analisado o crescimento microbiano pela turvação dos meios de cultura. Para confirmação dos resultados, um inóculo de 0,1mL de cada tubo foi obtido e transferido para outros dezoito tubos de caldo de BHI (Bacto^{TM}, USA), realizando condições idênticas de incubação. O crescimento bacteriano também foi avaliado pela turbidez do meio de cultura (Fig. 1). Para confirmar a presença da monocultura do meio turvo e ausência de contaminação no meio, foi realizada uma observação microscópica tendo como parâmetro a coloração de Gram. O teste de Gram confirmou a presença apenas de cocos Gram$^+$, condizentes com os *Streptococcus sanguis*.

O controle negativo foi utilizado para verificar a esterilidade do meio de cultura usado na pesquisa. Um tubo de ensaio contendo caldo de BHI (Bacto^{TM}, USA) não contaminado foi incubado a 37% por 48 h. Já o controle positivo foi utilizado para verificar a viabilidade

dos microrganismos. Um tubo com caldo de BHI estéril (Bacto^{TM}, USA) foi contaminado com inóculo (0,1 ml) de caldo na escala 1 de MacF e, em seguida, incubado a 37ºC por 48 horas. Também se realizou o teste de esterilidade dos cones de papel absorvente. Dois cones foram imersos em um tubo de ensaio contendo caldo de BHI estéril e, em seguida, incubado a 37ºC por 48 horas. Após a incubação foram avaliados através da turvação do meio.

Figura 1- Teste de exposição direta



Teste de Difusão em Ágar

Para o teste foram removidas colônias isoladas de uma placa de petri, contendo cepa *Streptococcus sanguinis* recém incubados (24 h). Os microrganismos foram transferidos para um tubo contendo caldo de BHI (Bacto^{TM}, USA) alcançando a turbidez de uma suspensão padrão na escala 1 de McFarland (3 x 10^8 células/mL). Com auxílio de swab de algodão estéril, os microrganismos foram retirados do tubo de ensaio e inoculados, através de esfregaço, pelo método da dispersão, em toda superfície seca de 4 placas de ágar Müeller-Hinton (140 mm).

Os discos de papel absorventes, com 5 mm de diâmetro, ficaram submersos por cinco minutos nas substâncias testes antes de serem aplicados nas placas inoculadas. Em cada placa usou-se 6 discos de papel estéril para a substância teste, colostro humano; 1 para o controle negativo, água destilada e 1 para o controle positivo, clorexidina a 2% (FGM, Brasil). Resultando em 24 discos para o colostro, 4 discos para água destilada e 4 discos para

clorexidina a 2%. Cada disco foi pressionado de encontro à superfície do meio Mueller Hinton (Himedia, Índia), de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Foram distribuídos por igual e eqüidistante um do outro, em seguida, foram incubadas a 37ºC por 48 horas. Os diâmetros, em milímetros, dos halos de inibição microbiana foram medidos sobre os discos de papel contendo as substâncias, valendo-se de duas medidas de forma perpendicular entre si, sendo obtida a média de seus tamanhos. Para esta medição, usou-se um paquímetro digital (Starrett, Brasil).

RESULTADOS

Os resultados para o teste de exposição direta são apresentados na tabela 1 e na figura 1, enquanto que para o ensaio de difusão em ágar são apresentados na tabela 2 e na figura 2 respectivamente. Não foi observado efeito antimicrobiano no teste de exposição direta após 48 h, para o colostro humano. Somente a clorexidina a 2% induziu a formação de halos de inibição.

Tabela 1: Análise macroscópica da turvação dos meios de cultura.

	TUBOS DE ENSAIO																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	CP	CN	CC
L1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

Legenda: (+) Turvação do meio e (-) Ausência de turvação do meio.
Abreviações: C/P- Controle positivo, C/N- Controle negativo, CC- controle de esterilidade do cone, L1- Primeira leitura de turvação do meio de cultura e L2- Leitura de confirmação dos resultados.

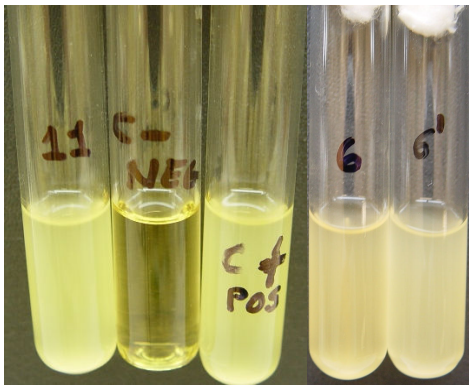


Figura 1: Comparação macroscópica da turvação dos tubos. C - NEG: Controle negativo; C+ POS: Controle positivo e Tubos 11, 6 e 6’ : tubos experimentais.

Pela coloração de Gram foi comprovado não haver contaminação da amostra por outros microrganismos. Os testes mostraram coloração para cocos Gram positivo, compatível com o *Streptococcus sanguis* (figura 2).

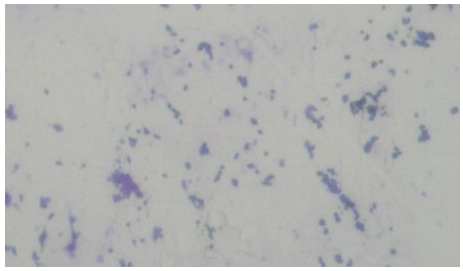


Figura 2: Análise microscópica tendo como parâmetro a coloração de Gram.

Tabela 2- Distribuição em milímetros dos halos de inibição da ação antibacteriana do colostro e da clorexidina a 2% testados contra linhagem de *Streptococcus sanguis.*

Placa de Petri	Colostro	Clorexidina a 2%
1	0	15,25
2	0	13,53
3	0	14,58
4	0	13,47
Média	0	14,21
Desvio-padrão	0	0,86

Análise pelo teste Anova, p= 0, 00003.

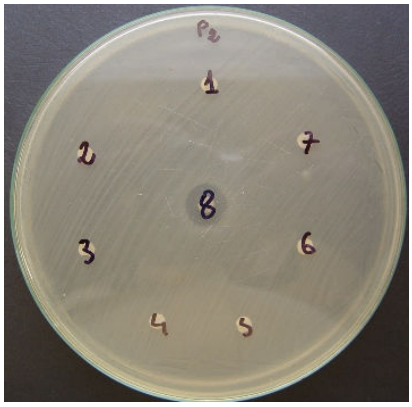


Figura 3: Halo de inibição da clorexidina a 2% sobre *Streptococcus sanguis.* Discos 1, 2, 3, 4, 5 e 6: colostro humano; disco 7: controle negativo (água destilada) e disco 8: controle positivo (clorexidina 2%).

DISCUSSÃO

Tem sido relato na literatura que o leite materno contém compostos com propriedades imunológicas, como imunoglobulinas, lactoferrina, oligossacarídeos, probióticos, ácidos graxos, hormônios e fatores de crescimento; como também, leucócitos maternos e citocinas (ISAACS, 2005; NEWBURG, 2005; COPPA et al., 2006; PARAMASIVAM et al. 2006). Estes compostos fornecem proteção ao neonato enquanto o seu sistema imunológico ainda é imaturo, e também atuam em sinergia com o trato gastrintestinal aumentando propriedades antimicrobianas (FIELD, 2005; ISAACS, 2005).

O leite humano tem se apresentado como sendo eficaz contra uma variedade de bactérias, vírus e protozoários. A importância clínica destes achados é observada por diversos estudos epidemiológicos que têm demonstrado menos infecções, especialmente gastrintestinais e infecções respiratórias, em crianças com amamentação exclusiva (CUNNINGHAM et al*.,* 1991). Além disso, recém-nascidos prematuros alimentados com leite da própria mãe, apresentam menos enterocolite necrosante, infecções respiratórias, septicemia e meningite, quando comparadas com aquelas alimentadas de outras formas (MCGUIRE e ANTHONY, 2003; CHAN, 2003).

Na área da Odontologia a amamentação também é estimulada pelos profissionais. Promove o correto desenvolvimento das estruturas do aparelho estomatognático por meio do equilíbrio das forças musculares de contenção interna e externa, influenciando assim o desenvolvimento de padrões musculares corretos, promovendo reflexos futuros na fala, na respiração e mastigação (SOUSA, 1997). Prevenindo desta forma as más oclusões (LEGOVIC e OSTRIC, 1991; PALUMBO e QUELUZ, 1999; CARVALHO, 2001) e os maus hábitos orais (COELI e TOLEDO, 1993).

Tendo como suporte a literatura científica que comprova a atividade antimicrobiana e imunológica do leite materno e com a visão de que o colostro materno seria importante para combater os primeiros microrganismos a se instalar na cavidade oral do recém nascido, surgiu a idéia de pesquisar está hipótese, uma vez que o colostro humano apresenta anticorpos, imunoglobulinas e substâncias como a lactoferrina e

lisosimas, que interferem na multiplicação e adesão das bactérias (SANCHES *et al.*, 2000).

No proposto estudo, ficou comprovado que o colostro não apresentou atividade antimicrobiana para o *Streptococcus sanguis* através do método de exposição direta e para o teste de difusão em ágar. Porém este resultado não está de acordo com outros estudos que conseguiram comprovar a atividade antimicrobiana do leite humano, usando a metodologia do teste de difusão em ágar, embora os microrganismos testados não fossem específicos da cavidade bucal, como *Staphylococcus aureus* (CHAN, 2003; OVALI et al., 2006), *Escherichia coli* (CHAN, 2003; OVALI et al., 2006) *e Enterobacter sakazakii* (CHAN, 2003; LENATI *et al*., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (OVALI *et al*., 2006); *Candida albicans* (OVALI et al.,2006). Todos estes estudos também comprovaram que a adição de ferro ao leite humano diminui sua eficácia antimicrobiana.

A lactoferrina é uma glicoproteina ferro dependente presente no leite materno (CHAN, 2003). O aumento da concentração de ferro no leite satura a atividade desta glicoproteina diminuindo seu potencial antimicrobiano (OVALI *et al*., 2006; CHAN, 2003; LENATI *et al*., 2008). O estado nutricional da doadora do colostro usado na nossa pesquisa pode ter influenciado no resultado antimicrobiano, uma vez que a suplementação de ferro, através de sulfato ferroso, é realizada em praticamente todas as unidades neonatal para evitar a anemia da gestante durante o seu pré-natal e do bebê após o nascimento.

Segundo Ovali *et al*. (2006), a lactoferrina se liga apenas ao ferro férrico, no entanto, mesmo se utilizando o ferro ferroso, este é rapidamente convertido em ferro férrico no organismo, ligando-se à lactoferrina. O ferro endógeno do colostro pode ter inativado a lactoferrina presente e assim ter refletido em um resultado diferente do encontrado na literatura. Para Ovali *et al*. (2006), se necessário, a suplementação de ferro deve ser dada separada do leite humano.

Outra hipótese que pode estar relacionado aos nossos resultados é que o colostro humano, por ser rico em proteínas e gorduras, pode funcionar como sendo um meio de

crescimento para o *Streptococcus sanguis* e, assim, não foi capaz de impedir o seu crescimento. Desta forma, devemos incentivar as mães a higienização da cavidade bucal dos bebês após a amamentação, mesmo sabendo do potencial antimicrobiano do colostro materno.

Com base nos resultados encontrados, a conclusão que o colostro materno não apresentou atividade antimicrobiana contra o *Streptococcus sanguis* merece mais investigações, seja pesquisando sua atividade em relação a outros microrganismos da cavidade oral, seja observando o estado nutricional da mãe, seja aumentando o número de amostras ou através de estudos clínicos, já que na literatura é muito evidente a potencialidade antimicrobiana do leite humano.

CONSIDERÇÕES FINAIS

De acordo com a metodologia utilizada o colostro materno não apresentou atividade antimicrobiana contra o *S. sanguis* em testes de exposição direta e halo de inibição em ágar.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. D. et al. Total and specific IgA in colostrum and milk of mothers of Natal-Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta cir. bras**; v.20, (supl.1), p.178-184, 2005.

BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **APMIS - Acta Pathol Microbiol Immunol Scand APMIS**, v.103, n.1, p.1-19, 1995.

CARBONARE, S.B. et al. Inhibition of HEp-2 cell invasion by enteroinvasive Escherichia coli by human colostrum IgA. **Int Arch Allergy Immunol**, v.108, p.113-8, 1995.

CHAN, G.M. Effects of powdered human milk fortifiers on the antibacterial actions of human milk. **Journal of Perinatology**, v.23, p.620–623, 2003.

COPPA, G.V. et al. Prebiotics in human milk: a review. **Digestion and Liver Disease**, v.38, (Suppl 2), p.291–294, dec. 2006.

COELI, B.M., TOLEDO, O. A. Hábitos bucais de sucção aspectos relacionados com a etiologia e com o tratamento. **Rev. Odontopediatr**, São Paulo, v.3, n.1, p.43-51, jan/fev/mar. 1993.

CUNNINGHAM, A.S., JELLIFFE, D.B., JELLIFFE, E.F. Breast-feeding and health in the1980s: a global epidemiologic review. **J Pediatr**, v.118, n.5, p.659–66, may.1991.

DE LORENZO, J.L. O ecossistema Bucal. *In*: Microbiologia para o Estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2004, cap.5, p.55-72.

DE LORENZO, J. L.; MAYER, M. P. A. Componentes bacterianos da microbiota bucal. *In*: Microbiologia para o Estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2004, cap.3, p.33-42.

FIELD, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **Journal of Nutrition**, v.135, n.1, p.1–4, jan. 2005.

GOLDMAN, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflamatory and immunomodulatory properties. **Pediatr Infect Dis J**; v.12, n.8, p.664-671, Aug.1993.

HANSON, L. A. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.81, n.6, p.523-533, Dec. 1998.

HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic Escherichia coli opsonized with colostral IgA. **Scand J Immunol**, v.46, n.1, p.59-66, Jul. 1997.

LEGOVIC, M., OSTRIC, L. The effects of feeding methods on the growth on the jaws in infants. **J Dent Child**, Chicago, v.58, n.3, p.253-255, may/june, 1991.

LENATI A, R.F. Growth and survival of Enterobacter sakazakii in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, n.1-2, p.171–179, 2008.

LOUREIRO, I. et al. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic Escherichia coli virulenceassociated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.27, n.2, p.166-71, Aug. 1998.

ISAACS, C.E. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p.1286–88, May. 2005.

MCGUIRE, W., ANTHONY, M.Y. Donor human milk versus formula for preventing necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v.88, n.1, p.11–4, Jan. 2003.

NEWBURG, D.S. Innate immunity and human milk. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p.1308–312, May. 2005.

OVALI, F., ÇIFTÇI, I.H., ETINKAYA, Z.C., BUKULMEZ, A. Effects of human milk fortifier on the antimicrobial properties of human milk. **Journal of Perinatology**, v.26, n.12, p.761-763, oct. 2006.

PALUMBO, A., QUELUZ, D.P. Avaliação de escolares: amamentados no peito e/ou na mamadeira em relação ao trespasse horizontal. **J Bras Odontopedriat Odontol Bebê**, Curitiba, v.2, n.5, p.42-48, abr/jun, 1999.

PARAMASIVAM, K. et al. Human breast milk immunology: a review. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 51, n.5, p.208–217, Sept./Oct. 2006.

SANCHES, M.A. et al. Human colostrum contains antibodies reactive to the Intimin-binding region of enteropathogenic Escherichia coli translocated receptor. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.30, p. 73-77, 2000.

SOUSA, A. M. L. A amementação e a odontologia. **Rev. Assoc Paul Cir Dent**, v. 51, n.4, p. 387, jul/ ago, 1997.

VASSÃO, R.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Phagocitic activity of colostrum macrophages. **Braz J Med Biol Res**, v.22, p.457-64, 1989.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biol Neonate**, v.74, n.2, p.121-133, 1998.