Artículo Original / Original Article

Calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche materna de madres donantes colombianas

Physicochemical and microbiological quality of breast milk from Colombian donor mothers

RESUMEN

La “leche humana”, constituye el mejor alimento que puede darse en forma exclusiva al recién nacido generando el vínculo físico-biológico más importante entre la madre y la cría tras el parto. En este trabajo se planteó un estudio de tipo observacional, descriptivo y retrospectivo transversal sobre las propiedades fisicoquímicas y calidad microbiológica de la leche humana suministrada por 68 madres lactantes en edades de entre 15 a 39 años, de dos estratos socioeconómicos colombianos asociados al departamento del Tolima, considerando tipos de leche calostro, transición y madura, en relación a los parámetros de calidad establecidos en los programas de bancos de leche humana, además del contenido de cloruros, fenoles, fósforo y el perfil de electroforesis para proteínas. Los resultados de las propiedades fisicoquímicas de las muestras presentan variabilidad según el tipo de leche, difiriendo en algunos casos entre los promedios observados en los parámetros por estrato social. El análisis microbiológico descarta cargas excesivas de enterobacterias lactosa positivas en términos de NMP, mostrando valores aptos para el consumo de los lactantes. La técnica de electroforesis revela la presencia de lactoalbúmina, inmunoglobulina, caseína, albumina y lactoferrina, no siempre reportados en este tipo de trabajos. La investigación realizada se consolida como guía e iniciativa para el desarrollo de trabajos similares en otras zonas del país y con ello el fortalecimiento de programas mundiales de lactancia materna.

Palabras clave: Calidad; Microbiología; Leche humana; Parámetros fisicoquímicos.

ABSTRACT

Human milk constitutes the best food that can be given exclusively to the newborn, generating the best and most important physical-biological link between the mother and her newborn. We conducted an observational descriptive and cross-sectional retrospective study on the physicochemical properties and microbiological quality of human milk supplied by 68 lactating mothers between 15 and 39 years of age from two Colombian socioeconomic strata in the Tolima department. We evaluated type of milk colostrum

Guillermo Salamanca-Grosso^{1,2*},
Mónica Patricia Osorio-Tangarife¹,
Kevin Fernando Romero-Acosta¹.

1. Grupo de Investigaciones Mellitopalinológicas y
Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos.
2. Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad del Tolima.

*Dirigir correspondencia a: Guillermo Salamanca-Grosso.
Campus Universitario Santa Elena Parte Alta.
Ibague, Tolima. Colombia.
CP: 730006299. Colombia.
E-mail: gsalaman@ut.edu.co

Este trabajo fue recibido el 16 de julio de 2018.
Aceptado con modificaciones: 16 de noviembre de 2018.
Aceptado para ser publicado: 05 de enero de 2019.

transition and mature, with respect to the quality parameters established in human milk bank programs, in addition to Chloride, phenol, phosphorus content and protein profiles for using electrophoresis. Microbiological analysis discards excessive loads of lactose positive *Enterobacter* in terms of MPN, showing values suitable for the consumption of infants. The electrophoresis technique reveals the presence of lactalbumin, immunoglobulin, casein, albumin and lactoferrin, not always reported in this type of work. This research can be a guide and initiative for the development of similar work in other areas of the country and with it the strengthening of global breastfeeding programs.

Keywords: Human milk; Microbiology; Physicochemical parameters; Quality.

INTRODUCCIÓN

La leche humana (LH), en sí misma es un fluido biológico de naturaleza compleja, con amplia variabilidad según el momento de la lactancia, como calostro, leche de transición o madura, entre otras consideraciones que la hacen diferente en cuanto a su composición. Sus cualidades nutricionales e inmunológicas son únicas e insustituibles¹. Las proteínas (lactoalbúmina, lactoferrina), vitaminas (C y del grupo B), antioxidantes endógenos (α -tocoferol, retinol), pool de enzimas (catalasa, glutatión peroxidasa) y minerales (cobre, manganeso, zinc), los anticuerpos y factores de crecimiento, son esenciales en el desarrollo de los lactantes^{2,3}.

La composición de la LH, varía de una madre a otra y en cada mujer, en el transcurso del día e incluso en una misma mamada. La fracción más estable es la proteica y la grasa es el elemento de mayor variabilidad, y son diversos los factores que inciden en estructura, composición y en los volúmenes de secreción, que son dependientes de factores genéticos, de la nutrición materna y de su condición socioeconómica³.

La LH, es el alimento preferente de lactantes prematuros a causa de su composición previniendo la retinopatía grave prematura, la enterocolitis necrotizante, y la meningitis, contribuyendo al crecimiento y mejora al desarrollo de tejidos y su nivel neurológico^{4,5,6}. La inducción metabólica para la generación de LH es concomitante con las fases de lactogénesis y galactopoyesis⁷. En la fase de producción, las propiedades fisicoquímicas presentan variabilidad. El aporte de proteínas es mayor en las primeras semanas y decrece con la intensidad y periodo de lactancia⁸. Las proteínas, la fracción grasa y los minerales de la LH, afectan significativamente el pH, acidez natural, la viscosidad, la tensión superficial, el índice de refracción y la conductividad eléctrica, que son dependientes de la fracción de electrolitos, mientras que la tensión superficial es influenciada por las proteínas, fosfolípidos y los monos y diglicéridos⁹.

Los lípidos constitutivos de la LH, representan la mayor fracción energética de la leche, que es cerca del 60% del aporte energético total. Los triglicéridos de la LH, compuestos principalmente por ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, representan hasta el 88%, considerando el docosahexaenóico (DHA), el ecosopentanóico (EPA) y el araquidónico (AA)^{7,10}.

La acidez de la leche humana en general obedece a la transformación de la lactosa en ácido láctico, por efecto de los microorganismos allí presentes, con la consecuente reducción del potencial de hidrógeno (pH) y aumento de los títulos de acidez Dornic ($^{\circ}$ D)¹¹. La lactosa es el disacárido de menor variabilidad entre los macronutrientes no obstante, los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa son frecuentes en distintas proporciones y se acompañan además de ácido siálico, L-fucosa y N-acetilglucosamina, de donde deriva su poder reductor, que favorecen el desarrollo de la flora intestinal, la absorción de calcio, la generación de galactosa, así como los factores genéticos^{10,13}.

En relación al aporte e importancia de la fracción grasa se

observado que cuanto mayor es de ésta, mayor es el contenido calórico de la leche y menor el de inmunoglobulinas¹⁴. Por su parte la fracción proteica, se ha relacionado con funciones de regulación del peso corporal del lactante. En LH, las proteínas provienen en su mayoría de la fracción del suero y las principales son las lactoalbúminas y el grupo de las Caseínas (β y K).

El fósforo, es un componente estructural importante de las membranas celulares y ácidos nucleicos para los procesos biológicos, la biodisponibilidad, se ha relacionado con el calcio y la caseína.

La calidad microbiológica de la LH, en muchos estudios se ha mantenido al margen. La contaminación y posterior deterioro de este producto, se presenta por transferencia vertical entre la madre y el lactante^{2,10,15}. Las bacterias lácticas se transfieren al recién nacido a través de la LH. La microbiota intestinal de niños y adultos es dependiente de los hábitos de las madres lactantes^{16,17}. Los microorganismos piel-entéricos asociados a la LH, han sido descritos e identificados a través de cultivos de enriquecimiento y el uso de técnicas moleculares para especies del tipo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Pseudomonas* y *Clostridium*¹⁸.

La falta de estudios sobre la calidad de la leche humana en estratos socioeconómicos vulnerables en Colombia, plantea un estudio sobre la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche de madres lactantes colombianas en cuatro localidades del departamento del Tolima, considerando sus condiciones socioeconómicas y tipo de leche como estrategia de indagación de grupos sociales menos atendidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo realizado es de tipo observacional, retrospectivo y descriptivo de corte transversal, en el cual se han evaluado 68 mujeres sanas en etapa de lactancia de edades comprendidas entre 15 y 39 años, residentes en cuatro localidades del departamento del Tolima, Colombia. Las madres fueron convocadas por el programa de lactancia y desarrollo infantil de cada uno de los hospitales en sus lugares de residencia, actividad que dio paso a una fase de capacitación y encuesta, de indagación sobre el estatus y condiciones socioeconómicas (escolaridad, edad, número de hijos, actividad económica, tipo de vivienda e información relacionada con parámetros nutricionales de las madres), de las mujeres convocadas, para los estratos uno y dos, conforme a los criterios de estratos sociales establecidos por el gobierno nacional a través del Departamento Administrativo Nacional de Estadística, (DANE).

Se consideró que la extracción de leche no afectara las exigencias del lactante y estuvieran dispuestas a donar el excedente en forma voluntaria, el volumen convenido se mantuvo entre 40 y 50 ml además de que no estuvieran consumiendo medicamentos de ningún tipo, alcohol, fumar y que cumplieran las normas de higiene peticionadas para la extracción y conservación de las muestras, éstas fueron colectadas entre las 9:00 y 11:00 am. Las madres

donantes procedieron a realizar la higienización, lavado de mamas con agua y secado con gasa estéril, posteriormente fueron asistidas por el personal de servicio del hospital. Las muestras, fueron colectadas tras el proceso de donación previamente descrito, con acompañamiento de personal médico y paramédico adscrito a los hospitales de San Roque (Alvarado), San Vicente Paul (Fresno), San José (San Sebastián de Mariquita) y Santa Bárbara (Venadillo) en el Departamento del Tolima, Colombia. Las muestras se dispusieron a -5 °C hasta el momento del análisis. El muestreo realizado fue no probabilístico de casos consecutivos.

Aspectos éticos

Las madres vinculadas al proceso de investigación de la calidad de LH, recibieron capacitación sobre la importancia de asistir a los niños lactantes. El tratamiento a las donantes se realizó sin prevenciones ni discriminación de edad. Se les indicó que las muestras recolectadas y cuestionarios completados serían utilizados específicamente para los propósitos de la investigación, no siendo empleados para otros fines y con absoluta reserva y confidencialidad. El proceso se consolidó con la firma de un consentimiento informado.

CARACTERIZACIONES

Las muestras de LH, sometidas a congelación fueron pasteurizadas, por 30 min. a 62,5 °C y posteriormente en agua a 0 °C y luego hasta 5 °C, con el fin de obtener el efecto del choque térmico. Se realizaron análisis microbiológicos y fisicoquímicos fueron caracterizadas, conforme a la metodología descrita.

Determinaciones microbiológicas

Las determinaciones microbiológicas para enterobacterias lactosa-positivas, se realizan usando la detección de número más probable (NMP). Las muestras de leche fueron evaluadas siguiendo los criterios de diluciones en serie (1:10, 1:100 y 1:1000), dispuestas en tubos de 10 mL con caldo Verde Bilis Brillante (BGBL) a 2% p/v. Tras la inoculación e incubación a 37°C ± 0,5, se realizaron lecturas a 12, 24 y 48 horas. La presencia de gas en el interior del tubo Durham caracterizó como positivo. El NMP, se determinó siguiendo las directrices de la microbiología alimentaria²⁹.

Análisis fisicoquímicos

Previo a los análisis las muestras de LH, fueron atemperadas a 20 °C por 40 min. en baño termostático de recirculación. Los parámetros caracterizados fueron densidad, humedad, conductividad eléctrica (CE), expresado en su fracción de crema, grasa, calorías, proteínas (caseína), pH, acidez total (°D), sólidos solubles (°Brix), contenido de fenoles totales, cloruros, fósforo y perfil electroforético.

Acidez total

El grado de acidez de las muestras, se realizó determinando los grados Dornic (°D). A 2 mL de muestra de leche humana se le adicionaron 2 gotas de solución

indicadora de fenolftaleína hidroalcohólica al 1% p/v. La mezcla resultante se tituló con solución estandarizada de hidróxido de sodio (NaOH 0,1 N). Se adicionó la solución hasta cambio de color rosa. Los mL gastados se multiplicaron por 10, para expresar la acidez Dornic (°D).

Potencial de hidrógeno (pH) y Conductividad eléctrica (CE)

En la LH, la aplicación de esta prueba se realizó para corroborar la acidez y descartar la actividad microbiológica. Las muestras fueron previamente acondicionadas en baño termostático a 20 °C. Los resultados fueron expresados en $\mu S\ cm^{-1}$ a 20 °C.

Sólidos solubles (°Brix) y Humedad

Para efectuar las mediciones se usó refractómetro digital, con calibración previa de control con agua destilada y desmineralizada para establecer el cero a una temperatura de 20 °C.

Densidad

Las determinaciones se realizaron haciendo uso de picnómetros de 10 mL, que fueron llenados convenientemente y pesados para estimar la densidad de las muestras a partir de la relación entre el peso y el volumen.

Crematocrito, fracción grasa y calorías

Los análisis de Crematocrito, se efectuaron por el método de separación física de centrifugación a 10.000 rpm por 15 min, las determinaciones se hicieron por triplicado, usando capilares de 75 mm de largo con diámetro interno de 1,15 mm (VitrexTM Bris, Herlev Alemania), siguiendo los protocolos descritos por RED-BLH. Los capilares se sumergieron en cada una de las muestras de trabajo, sellando los extremos con plastilina. Posteriormente, fueron removidos y se determinó la relación de fases para crema y suero respecto del total. Las fracciones evaluadas permitieron determinar la fracción de grasa, crema y valor energético (calorías), a partir de las ecuaciones que se describen a continuación:

$$\text{Crema (\%)} = \frac{CC\ (mm)}{CT\ (mm)} \times 100$$

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{\text{Crema (\%)} - 0,59}{1,46 \times \text{grasa (\%)}}$$

$$\text{Calorías (kcal/L)} = (\% \text{ de crema} \times 66,8 + 290)$$

Donde CT (mm) y CC (mm) representan las longitudes de columna de crema total y de crema leídas en el capilar.

Cloruros

Las determinaciones se realizaron sobre muestras frescas, mediante técnicas microvolumétricas, con una precisión de 1,0 μL . Se dispusieron 100 μL de muestra que

fueron diluidas en 10 mL de agua destilada libre de cloruros. El punto final de las titulaciones se estimó a partir de la formación de un precipitado de cloruro de plata usando indicador de cromato de potasio. La cuantificación procedió por argentometría. El contenido de cloruros se determinó a partir del volumen de nitrato de plata a punto final. Las muestras homogenizadas se llevaron a 40 °C durante 10 min.

Fósforo

El contenido de fósforo $[P-PO_4]^{3-}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, se determinó recuperando la fracción insoluble de muestras de LH frescas sometidas a hidrólisis ácida (2 mL de muestra acidificada). El proceso condujo a la formación de un precipitado y una fracción insoluble. El líquido sobrenadante se usó para la cuantificación espectrofotométrica, usando un volumen de 500 μL , que se mezclaron con 500 μL de agua destilada y 400 μL de solución de Molibdato de amonio. La mezcla se vortizó y se adicionaron 50 μL de cloruro estañoso en glicerina. El volumen final, fue de 10 mL y las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 690 nm.

Fenoles totales

La determinación de los fenoles totales, se efectuó a través del método de Follin Ciocalteu, con ligeras modificaciones. Se añadió una alícuota de muestra (1000 μL) y se mezcló con 4000 μL de solución de metanol-agua (1:1). Se dispusieron 250 μL de soluciones de Carrez I y II. La mezcla resultante se centrifugó durante 15 min. a 5000 rpm. Para las determinaciones, se usó 100 μL del sobrenadante de la muestra, con 1000 μL de Follin (1:10), 100 μL de agua y 800 μL de carbonato sódico. Después de 60 min., fue medida la absorbancia de la mezcla a 765 nm contra un blanco de agua destilada.

Electroforesis

Para la caracterización de proteínas se usó electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes y en presencia SDS-PAGE, con concentración del gel de corrida al 10%. Este procedimiento se implementó para obtener un patrón normal de corrida y separación de las proteínas presentes en las muestras de leche incluidas en el estudio. Se usaron patrones moleculares de 10 a 250 kDa marca BIO-RAD. La metodología implementada correspondió a la descrita por Laemmli, (1970) con ligeras modificaciones. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de coomassie. El perfil obtenido, se evaluó por densitometría haciendo uso del software Image J (National Institutes of Health).

Proteína Total

Se determinó directamente sobre las muestras de leche, luego de un proceso de acidificación con ácido clorhídrico y separación de la proteína total. 5 mL de cada muestra se dispusieron en viales con posterior acidificación y agitación rotatoria constante durante 24 h., que permitió la separación de la fracción insoluble. Las mezclas

resultantes se centrifugaron a 4000 rpm, para recuperar el sobrenadante. La fracción insoluble se desecó a 65°C por 12 h, que posteriormente se cuantificó en términos de porcentaje peso/peso y volumen/volumen.

Análisis Estadístico

Los resultados de todas las pruebas fueron realizadas a través del programa estadístico JMP 14 Pro™. Se realizaron tablas de contingencia se proyectaron, considerando los estratos socioeconómicos 1 (E1) y 2 (E2) y tipo de leche: Calostro (C), Transición (T) y Madura (M).

RESULTADOS

El estudio involucró 68 madres lactantes sanas, de estratos socioeconómicos (E1) y (E2), que correspondieron a una población pobre y vulnerable con bajos ingresos económicos y que son beneficiarias de subsidios del estado en los servicios públicos, auxilios de vivienda, educación y atención en salud a través del Sistema de Selección de Beneficiarios para Programas Sociales (SISBEN). En el estudio observacional, retrospectivo y descriptivo de corte transversal, el mayor número de muestras correspondió a madres del estrato E1 (55) en relación al estrato E2 (13), con predominio de leches maduras y menor proporción para calostro y transición (Tabla 1). En la población de madres donante se identificaron grupos de mujeres con edades comprendidas en tres grupos: 15 a 23 años (39,7%) del total, 24 a 32 (36,8%) y 32 a 39 (23,5%) respectivamente.

El estudio de los resultados del análisis microbiológico (NMP ufc/mL), ha revelado baja incidencia de enterobacterias lactosa-positivas, a 12, 24 y 48 h, con valores en el rango ≤ 3 a 11 ufc/mL , considerados como deseables, en general el crecimiento no significativo (Tabla 2). Se destaca que la muestra de LH tipo calostro, presentó los más altos valores de enterobacterias-lactosa positivas. En el muestreo global a 12 h, el 80,9% de las muestras presentaron niveles de ≤ 3 ufc/mL , aunque se observaron niveles de 3,6 ufc/mL (10,3%), además de 6,1 y 7,4 ufc/mL (2,94%) y en menor proporción 7,2 y 11 ufc/mL (1,47%). Los cambios de mayor significación se presentaron a 24 y 48 h. Los conteos desde las 12 h en las muestras evaluadas, se redujeron de manera significativa a ≤ 3 ufc/mL , dando paso a los valores de 3,6 a 11 ufc/mL , como se ilustra en los gráficos de mosaico de los análisis de contingencia (Figura 1).

En cuanto a los parámetros físicoquímicos, densidad, gravedad específica (20/20), humedad, conductividad eléctrica (CE), sólidos secos y solubles, pH, acidez total (°D), cloruros, fósforo, crematocrito, grasa, fenoles totales, fracción de proteínas y perfil electroforético de las muestras de LH de madres lactantes de los estratos E1 y E2, se presentan en la tabla 3. El tenor de pH y la acidez Dornic, confieren a las muestras un ligero carácter ácido. Los valores medios de pH de las muestras de LH de Mariquita fueron de 7,25 más altos que los observados en Alvarado 6,68, pero comparables con los de Venadillo 7,15 y los de Fresno con 6,48. Los valores más bajos se presentaron en las muestras

Tabla 1. Distribución muestras de leche materna por localidad, estrato social.

Municipio	Tipo					n (%)	
	C (%)		T (%)	M (%)		E1	E2
	E1	E2	E1	E1	E2		
Alvarado	2 (2,94)	1 (1,50)	-	5 (7,35)	2 (2,94)	7 (10,3)	3 (4,41)
Fresno	-	-	-	18 (26,5)	8 (11,8)	18 (26,5)	8 (11,8)
Mariquita	-	-	-	11 (16,2)	1 (1,47)	11 (16,2)	1 (1,50)
Venadillo	-	-	1 (1,50)	18 (26,5)	1 (1,50)	19 (27,9)	1 (1,50)
Totales	3 (4,44)		1 (1,50)	64 (94,1)		68 (100)	

E1 y E2: Estrato socioeconómico. C: Calostro. T: Transición. M: Madura. n (%): Número de muestra.

Tabla 2. Distribución de valores del NMP por tipo de leche humana de cuatro zonas del Tolima.

Municipio	TL	E1			n	E2		
		n	12	24		12	24	48
Alvarado	C	1	7,2	11	11	2	≤ 3	≤ 3
		1	≤ 3	≤ 3	6,1	1	≤ 3	≤ 3
	M	3	≤ 3	≤ 3	6,1	1	≤ 3	≤ 3
		1	3,6	11	11	-	-	-
		1	≤ 3	≤ 3	≤ 3	-	-	-
Fresno	M	12	≤ 3	≤ 3	≤ 3	5	≤ 3	≤ 3
		2	≤ 3	≤ 3	6,1	1	≤ 3	≤ 3
		1	≤ 3	≤ 3	7,4	1	≤ 3	≤ 3
		2	≤ 3	≤ 3	11	-	-	-
		1	7,4	7,4	7,4	-	-	-
Mariquita	M	1	≤ 3	≤ 3	≤ 3	1	≤ 3	≤ 3
		2	≤ 3	7,2	7,2	-	-	-
		1	≤ 3	≤ 3	6,1	-	-	-
		1	3,6	7,4	11	-	-	-
		1	6,1	6,1	6,1	-	-	-
		2	3,6	3,6	3,6	-	-	-
		1	11	11	11	-	-	-
		1	≤ 3	11	11	-	-	-
		1	≤ 3	6,1	6,1	-	-	-
Venadillo	T	1	≤ 3	≤ 3	≤ 3	-	-	-
		5	≤ 3	≤ 3	≤ 3	1	≤ 3	≤ 3
	M	3	≤ 3	3,6	3,6	-	-	-
		2	≤ 3	≤ 3	6,1	-	-	-
		1	≤ 3	≤ 3	7,4	-	-	-
		1	≤ 3	6,1	6,1	-	-	-
		1	≤ 3	≤ 3	7,2	-	-	-
		2	3,6	3,6	3,6	-	-	-
		1	3,6	3,6	7,4	-	-	-
		1	7,4	11	11	-	-	-
		1	6,1	6,1	6,1	-	-	-

C: Calostro. T: Transición. M: Madura. TL: Tipo de leche. E1, E2: Estrato socioeconómico. n= número de muestras.

Figura 1. Representación del análisis de contingencia de NMP de muestras de LH a 24 y 48 h, en cuatro localidades del Tolima.

de LH de Fresno de los estratos E1 y E2 en leches maduras comparables con la de calostro de Alvarado (E2), pero que difirieron ligeramente de los valores de muestras de LH de E1 (C y M) y E2 (M) en su orden. Entre tanto, las muestras de Mariquita y Venadillo fueron más altas en LH maduras y de transición.

Los datos de acidez total en general, presentan diferencias con respecto a los valores de las muestras de Fresno, que exhibieron un ligero comportamiento alcalino. Los promedios de las muestras de Alvarado, Mariquita y Venadillo, no presentaron diferencias importantes. En promedio para todas las muestras, la acidez Dornic son mayores las de Fresno que las de Alvarado, Mariquita y Venadillo. Estas presentan similitud para este parámetro. El contenido de humedad en las muestras de LH, presentó variabilidad en el grupo de Alvarado entre 85,3 y 98,8% p/v, en relación de los otros grupos. Cuyos valores medios fueron del orden de 86,7% en Fresno, 88,6% en Mariquita y 88,2% en Venadillo. Mayores contenidos de humedad están relacionados con valores más bajos de densidad, este parámetro varió de 0,830 a 1,110 g mL⁻¹, siendo mayor en las muestras de Fresno.

Los sólidos solubles totales, para el grupo de muestras de LH fluctuaron entre 8,00 y 12,7 °Brix. En las muestras de Alvarado y Mariquita de LH de E1 y E2, fueron más bajos que los observados en la localidad de Fresno y Venadillo. La conductividad eléctrica (CE), presentó diferencias estadísticas significativas entre los grupos de muestras y por estrato en un amplio rango desde 1188 a 3670 $\mu\text{S cm}^{-1}$. El registro más alto se observó en LH de Fresno del E1. Comparativamente las muestras de Mariquita y Venadillo, en los estratos E1 y E2 no presentaron diferencias importantes en el parámetro, pero sí en el número de muestras de cada categoría. Conductividades bajas (1188 a 1634 $\mu\text{S cm}^{-1}$), son indicativas de muestras de LH con bajos niveles de electrolitos (Tabla 3).

Los cloruros y el fósforo $[\text{P-PO}_4]^{3-}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, han sido identificados como componentes importantes de las matrices de leche materna. Los cloruros de las muestras

de LH de forma global, oscilaron entre 21 a 39 meq L⁻¹. Las muestras de LH con mayor contenido son las del E2 de Alvarado tanto para las leches de tipo calostro y madura y las más bajas fueron las de Mariquita tanto en E1 como en E2. Los valores del parámetro de fósforo en las leches estudiadas fueron del orden de 4,11 a 15,8 $[\text{P-PO}_4]^{3-}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ con un promedio de entre 7,63 (E2 de leches maduras de Mariquita) a 10,9 $[\text{P-PO}_4]^{3-}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ (E1 de leches maduras de Venadillo).

Conforme a la técnica de crematocrito, la fracción de crema, grasa y calorías corresponden a parámetros íntimamente relacionados. En leche humana, el parámetro con mayor variabilidad corresponde a la fracción lipídica, en consecuencia, los datos globales fueron del orden de 2,18 a 19,7 g dL⁻¹. En el caso de la fracción de crema, el rango observado se presentó entre 2,30 a 29,1%, siendo más bajos en muestras maduras de Mariquita (6,92%) y Venadillo (7,16%) correspondientes al E1. Estos datos son significativamente menores de los observados en muestras maduras de Fresno, Mariquita y Venadillo del E2. La muestra de leche tipo calostro de E2 de Alvarado iguala la de E1 de Fresno, presentó un valor alto. La fracción de grasa de las LH del E2 de leches maduras de Fresno fueron significativamente mayores respecto de los valores observados en las muestras de Mariquita y Venadillo de E1, mientras que las LH de tipo calostro de Alvarado presentaban del E2 fueron del orden de 7,10 a 7,42%. La información energética asociada a las determinaciones reveló niveles del orden de 441,8 a 2.248 kcal/L, esta última correspondió a LH maduras de Fresno de E2. La muestra de LH de transición de Venadillo del E1 fue de 848 kcal/L.

El componente proteico de la LH, al igual que la grasa, es un parámetro que se expresa en un amplio rango (0,40 y 1,96%). El contenido de caseína (principal componente proteico), de las muestras de leches maduras de Alvarado y Mariquita con 1,70 y 1,73%, respectivamente. Otros tipos de leche en promedio y por estrato no presentaron diferencias importantes.

El análisis densitométrico generado a partir del perfil

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos asociados a muestras de leche materna de madres donantes del Tolima.

Parámetros	Alvarado				Fresno		
	E1		E2		E1	E2	
	C	M	C	M	T	M	M
pH	6,67 (0,07)	6,77 (0,38)	6,50 (0,01)	6,77 (0,16)	-	6,49 (0,37)	6,41 (0,47)
Acidez	2,98 (0,44)	4,37 (3,60)	3,48 (0,01)	3,02 (0,54)	-	7,62 (3,04)	6,26 (1,64)
Humedad	92,1 (3,56)	88,8 (5,25)	98,6 (0,01)	93,4 (5,32)	-	86,6 (1,83)	86,3 (2,13)
Densidad	1,001 (0,009)	0,988 (0,033)	0,970 (0,007)	0,990 (0,009)	-	1,020 (0,02)	1,010 (0,01)
Brix	9,20 (0,24)	8,72 (0,22)	8,95 (0,07)	9,28 (0,15)	-	9,60 (0,59)	9,95 (1,19)
Fenoles	133 (6,78)	84,9 (5,70)	55,8 (1,11)	205 (10,2)	-	163 (3,51)	149 (2,81)
Cloruros	30,4 (1,03)	29,5 (4,01)	33,8 (0,35)	33,3 (2,90)	-	26,4 (4,56)	26,7 (2,94)
Grasa	7,10 (2,23)	5,34 (1,73)	7,42 (0,10)	5,91 (1,85)	-	6,36 (0,23)	8,11 (0,49)
Crema	10,9 (3,27)	8,40 (2,52)	11,4 (0,15)	9,23 (2,71)	-	9,78 (0,33)	12,4 (7,24)
Calorías	1019 (218)	850,0 (168)	1053 (10,3)	906,0 (18,1)	-	950,0 (22,5)	1121 (48,3)
Fósforo	9,12 (0,25)	10,5 (1,03)	9,52 (0,11)	9,45 (3,92)	-	8,82 (0,32)	7,39 (2,55)
CE	1063 (4,30)	1785 (2,47)	1029 (1,41)	1428 (2,36)	-	1868 (79,9)	1579 (8,88)
Caseína	1,02 (0,71)	1,51 (0,47)	1,27 (0,01)	1,73 (0,02)	-	1,08 (0,25)	1,08 (0,15)
<i>n</i>	2	5	1	2	-	18	8

Parámetros	Mariquita				Venadillo		
	E1		E2		E1	E2	
	C	M	C	M	M	T	M
pH	-	7,23 (0,23)	-	7,25 (0,007)	7,20 (0,30)	7,42 (0,01)	7,17 (0,007)
Acidez	-	2,84 (0,02)	-	4,75 (0,07)	3,99 (0,78)	3,55 (0,07)	7,95 (0,07)
Humedad	-	88,3 (1,75)	-	89,5 (0,05)	89,8 (4,03)	88,0 (0,12)	84,2 (0,05)
Densidad	-	0,95 (0,04)	-	0,98 (0,005)	0,97 (0,05)	0,96 (0,001)	0,84 (0,01)
Brix	-	8,83 (0,44)	-	8,65 (0,07)	9,10 (0,48)	8,85 (0,07)	9,20 (0,14)
Fenoles	-	116 (3,60)	-	76,3 (1,11)	103 (9,13)	98,4 (5,57)	123 (2,22)
Cloruros	-	25,9 (1,84)	-	23,8 (0,35)	29,5 (4,52)	28,8 (0,35)	30,3 (0,35)
Grasa	-	4,33 (0,19)	-	7,95 (0,28)	4,50 (0,16)	5,32 (0,44)	7,21 (0,19)
Crema	-	6,92 (0,27)	-	12,2 (0,42)	7,16 (0,20)	8,35 (0,65)	11,1 (0,29)
Calorías	-	752,4 (18,5)	-	1105 (28,1)	769,0 (16,0)	848,0 (4,38)	1033 (19,4)
Fósforo	-	8,30 (0,18)	-	7,63 (0,01)	10,9 (0,20)	9,03 (0,03)	7,59 (0,11)
CE	-	1356 (14,1)	-	1080 (3,53)	1375 (29,9)	1191 (4,24)	1431 (14,8)
Caseína	-	1,53 (0,04)	-	1,70 (0,002)	1,04 (0,02)	0,99 (0,02)	1,06 (0,06)
<i>n</i>	-	11	-	1	18	1	1

E1, E2: Estrato socioeconómico. *n*: Número de muestras; (% de casos respecto del total). C: Calostro. T: Transición. M: Madura.

electroforesis de las muestras de LH de las cuatro zonas evaluadas, en general presentan un perfil similar, con 5 bandas representativas de proteínas características (60-70 kDa) y (25-39 kDa) propias de caseínas β y k , respectivamente, α -lactoalbúmina (50-53 kDa) y β -lactoglobulina (102-105 kDa). Los porcentajes del total electroforético separado, se recogen en la tabla 4. β -Lactoglobulina, es mayor en las muestras de Alvarado, pero α -Lactoalbúmina, es mayor en las muestras de LH de Venadillo y k -Caseína en las muestras de LH de Mariquita.

Los fenoles totales en las muestras de LH de Alvarado, Fresno, Mariquita y Venadillo, presentaron amplia variabilidad, en un rango dinámico que fluctuó entre 32,9 a 430,1 mg equivalentes de A. Gálico por litro (EAG L⁻¹). En las muestras de LH maduras de Alvarado (E2), se observó una mayor proporción de fenoles al igual que las de calostro de E1. Los valores de las muestras de Fresno (E1 y E2) y Venadillo (E2) aunque con ligeras variaciones, resultaron comparables.

DISCUSIÓN

La composición de la leche humana es dinámica y varía dentro de una dieta, a lo largo de periodos de lactancia, entre las madres en diferentes grupos sociales, que además está influenciada por la raza, la religión y hábitos nutricionales y varía en gran medida con las condiciones geográficas, urbanas y rurales. Los contaminantes de origen fecal ocupan el primer lugar en las metodologías que se basan en indicaciones de calidad. La calidad de las LH, son dependiente de los elementos que se reúnen en la fracción emulsificada, en suspensión y en solución. Un incremento de esta última fracción causa variabilidad entre los parámetros. La investigación sobre calidad microbiológica de las muestras de leche materna provenientes de los grupos socioeconómicos de los estratos sociales E1 y E2 de cuatro localidades, en términos de recuento de coliformes enterobacterias-lactosa positivas, que fueron evaluadas a 12, 24 y 48 h, exhibieron características microbiológicas aceptables. Los valores observados fueron inferiores del rango 1 a 3×10^2 ufc/mL, que suelen ser valores aceptables. El límite máximo se ha establecido en el rango 6 a 8×10^2 ufc/mL, cualquier valor por encima de esta concentración

puede ser compatible con un cuadro de mastitis infecciosa. La concentración máxima de bacterias que se puede esperar en una muestra de leche con mastitis se sitúa entre 1 y 3×10^6 ufc/mL^{16,17}.

La microbiota intestinal de los neonatos, está influenciada por la calidad de la leche materna que puede variar en el periodo de lactancia, puesto que se ha estimado que la ingesta bacteriana diaria en consumo hasta de 800 mL oscila entre 1×10^5 a 1×10^7 . Los resultados de los análisis microbiológicos del estudio, muestran una variabilidad en términos de NMP respecto de las condiciones socioeconómicas de las madres donantes, entre estratos, entre localidades y entre los días de cosecha de las muestras, aspecto que pueden explicar los cambios de la microbiota, con un aumento notable y rápido de *Staphylococcus* coagulasa positivos y disminución progresiva de especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, que no es el caso de las leches estudiadas^{27,28}.

El potencial probiótico de las bacterias presentes en la leche materna debería ser un motivo de reflexión para profesionales de la salud implicados en temas de lactancia. A la fecha persiste un desconocimiento de la microbiota específica de la leche materna, que a nivel de bancos de leche se decida desechar muestras con recuentos totales de entre 1×10^3 y 1×10^5 ufc/mL, a pesar de que dichas concentraciones se encuentran de forma natural en la leche de prácticamente cualquier mujer sana^{27,28}.

Los parámetros de calidad de la LH cambian considerablemente durante el periodo de la lactancia como resultado de factores fisiológicos y externos. La densidad de la LH, se debe a su composición lipídica, proteica y elementos esenciales, que son modificados por la dieta. Los valores del parámetro de densidad de las muestras evaluadas en este trabajo son comparables con otros estudios reportados en la literatura en el rango 0,987 a 1,060 g mL⁻¹ y que corresponden a la transición de calostro a leche madura^{9,13}.

La caracterización de las muestras de LH aportadas por las madres lactantes de los municipios de la zona norte del Tolima, se consolida como el primer trabajo de investigación relacionado con la evaluación de las

Tabla 4. Fracciones porcentuales de las proteínas en leche materna de madres lactantes de cuatro zonas del departamento del Tolima.

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Alvarado	Fresno	Mariquita %	Venadillo
β -Lactoalbúmina	102-105	44,00	22,9	17,8	15,00
β -Caseína	60-70	4,35	12,7	11,3	9,21
α -Lactoalbúmina	50-53	10,70	19,0	5,2	25,70
-Caseína	25-39	33,10	29,2	44,0	41,70

propiedades fisicoquímicas y microbiológicas planteado desde la universidad pública. En Colombia el Ministerio de Salud y Protección Social, ha establecido bancos de leche humana (BLH), con fines de promoción, protección y apoyo a la lactancia materna, con el cual se vieron favorecidos cerca de 1.583 neonatos y atendido cerca de 1.304 madres donantes en la vigencia 2015, con actividades realizadas en nueve BLH de Colombia, donde se adelantaron evaluaciones tendientes a la identificación de la calidad de la leche que ingresó a los BLH para los recién nacidos que se encontraban hospitalizados y especialHente para los prematuros. El trabajo planteado, identificó la variabilidad de la LH en madres lactantes en virtud de su condición socioeconómica e identificó directrices de calidad para el proceso de consolidación de la Red de BLH-Colombia.

El principal constituyente de la LH es el agua, que representa el 87% p/v, la variación en la concentración de sus constituyentes acarrea alteraciones proporcionales en su estructura²⁰. El pH obtenido en las muestras, oscilan entre 5,47 y 7,84, por su parte la acidez titulable inmediatamente ordeñada se encuentra entre 3 a 6 °D, sin embargo, estos valores cambian con el tiempo y las semanas de lactancia²², los valores obtenidos en el trabajo, son similares a los reportados en Brasil²¹.

La conductividad eléctrica (CE), de la LH en general, es dependiente de la concentración de electrolitos y de las especies iónicas disueltas en la matriz a una temperatura determinada²²; en LH, se han descrito medidas de CE, de 1500 a 3200 ($\mu\text{S cm}^{-1}$)⁹, que son acordes con los analizados en las muestras propias del estudio.

Los sólidos solubles de las LH se caracterizan por la presencia de lactosa, en este caso se presenta una relación lineal positiva entre los °Brix y los niveles de lactosa, azúcar que contribuye al metabolismo energético. Es un parámetro con reducida variabilidad que puede alcanzar niveles hasta de 1,0 g dL⁻¹, dependiendo de la etapa de lactancia y factores genéticos maternos^{3,6,9,10}. La lactosa parece ser un nutriente específico para el primer año de vida, su metabolismo es dependiente de la enzima lactasa, la concentración de lactosa es de 6,7 a 7,8 g dL⁻¹ y no varía en los momentos del día^{13,14}.

Los cloruros de la LH por su parte, se asocian a procesos digestivos y son responsables del equilibrio osmótico y regula el equilibrio ácido-base de los líquidos del organismo a nivel celular. Está relacionado con la actividad del sodio y del potasio. Se ha reportado un rango bastante amplio entre 35,9 $\pm$ 16,2 mg/100 mL ya que aporta al lactante soporte para crecimiento óseo y funcionamiento del aparato su digestivo^{10,15}. Las observaciones del parámetro de las muestras del Tolima, son comparables con los datos reportados en la literatura^{10,15}.

El fósforo es un componente estructural importante de las membranas celulares y ácidos nucleicos útil en procesos metabólicos. En LH se ha resaltado la biodisponibilidad de este elemento, que se encuentra asociado con la caseína y el calcio. Los valores medios reportados en la literatura

han sido de 15,0 $\pm$ 3,8 mg [P-PO₄]³⁻ 100 mL⁻¹ (150 μg P-PO₄⁻³ mL⁻¹)¹⁰, que de alguna manera son similares a los observados en las LH estudiadas, el parámetro redunda en el equilibrio Ca/[PPo₄]³⁻.

El conocimiento del valor nutricional de la LH puede ser evaluado a partir de los tenores de crematocrito. Esta metodología permite estimar el contenido lipídico y los niveles calóricos de distintos tipos de leche no procesada. En el contenido de crematocrito, diversos autores han reportado valores entre 3,9 y 7,0% de grasa (% g)^{14,33}, sin embargo, los valores encontrados difieren de este rango pues corresponden al rango entre 2,3 hasta 17,6%. Por otro lado, la fracción de grasa reportada con este mismo método, osciló entre 3,2 a 3,6 g dL⁻¹. El aporte calórico puede entenderse como un término de densidad energética y es indicador de la alimentación del lactante. La LH, en términos energéticos exhibe hasta de 70 kcal 100 mL⁻¹ (700 kcal L⁻¹), que es el aporte ideal; un bajo aporte de calorías va de 30 a 60 kcal 100 mL⁻¹ (300 a 600 kcal L⁻¹) y los niveles altos superan las 90 kcal 100 mL⁻¹ (900 kcal L⁻¹). Es importante anotar que el estado nutricional de la madre influye de forma notable en el valor de la LH y sería la causa más probable de variabilidad de los parámetros^{7,10}.

Las cantidades de proteínas son mayores durante las primeras semanas y va decreciendo de 16,3 (1,63%) hasta 8-9 (g L⁻¹)²³, este parámetro analizado en las muestras permitió identificar que son acordes con los descritos por las distintas investigaciones.

El aporte energético en términos de calorías de las muestras de LH, se estimó en 886,94 Kcal/L, sin embargo, diferentes estudios indican que las calorías de la LH son hasta de 700 Kcal/L, que es el aporte ideal, siendo la alimentación de las madres un factor dependiente al aporte de energía al lactante y para ello se han recomendado dietas no inferiores a 2000 Kcal al día²⁴.

El valor biológico de la LH reside en su fracción proteica, principalHente por la caseína. La fracción proteica de la LH materna es dependiente del tipo de leche. En LH tipo calostro, se han reportado valores de 21,5 $\pm$ 2,10 g L⁻¹, que son menores respecto de las LH de transición (9,80 $\pm$ 3,30) y maduras (5,70 $\pm$ 2,50) g L⁻¹ para el caso de leches de Serbia⁹. Las fracciones de caseína en la mayoría de las muestras de LH evaluadas en este estudio en g L⁻¹, resultan similares a los valores de leches madura y transicional.

En este trabajo, las proteínas separadas por electroforesis, han sido reportadas por diferentes investigadores^{1,3,9}. La caseína constituye el 40% de las proteínas, aunque puede llegar hasta tan sólo el 20%, y desde el punto de vista nutricional actúan como parte del factor bifidus, además de propiciar capacidad inmunomoduladora²³. El aporte de α -lactalbúmina, se relaciona con la síntesis de lactosa, proviene principalHente de suero con un alto potencial antigénico^{1,3,9}. En este trabajo, la lactoferrina se evidenció en mayor proporción en las muestras de Venadillo con la banda de 97,5 kDa, en las otras muestras solo se vieron picos cortos, pero no tan pronunciados. La importancia

de esta proteína reside en una función de defensa, con capacidad de ligar átomos de Fe^{+2} , factores bioactivos en la digestión del infante entre otros^{10,13}.

En la LH los fenoles actúan como agentes antioxidantes, son moléculas con función de prevención del daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos y es uno de los principales constituyentes de la leche humana. Los valores observados en este estudio, en algunos casos fueron mayores a los reportados en la literatura Vázquez y colaboradores²⁵, reportan valores entre $82.45 \pm 12.3 \text{ mg GAE L}^{-1}$ que son concordantes con las observaciones de LH de Alvarado y Marquita de leches maduras de E1 y E2, respectivamente. Los resultados y hallazgos descritos soportan nuevas directrices para estudios similares en otras zonas. Es importante anotar que la lactancia materna y la alimentación complementaria, son actividades prioritarias de atención al menor³⁰.

CONCLUSIONES

Se adelantó un estudio analítico de calidad relacionado con las propiedades fisicoquímicas y microbiológica de muestras de leche humana de madres lactantes de las localidades de Alvarado, Fresno, Mariquita y Venadillo en el departamento del Tolima, Colombia. Las observaciones de las evaluaciones realizadas en las muestras de leche materna, presentan amplia variabilidad según el tipo de leche y las condiciones socioeconómicas de las madres que aportaron las muestras de LH. El estudio microbiológico, reveló bajos niveles de enterobacterias lactosa-positivas, condición indicativa de un manejo apropiado del programa de lactantes en las zonas del estudio. Los parámetros de calidad en términos de proteína, contenido de fenoles, cloruros y fósforo y perfil electroforético para proteínas, se presentan como parámetros pioneros y de referencia que resultan de gran significancia en estudios de nutrición infantil. El aporte del trabajo puede valorarse desde la perspectiva de la salud pública, pues se llena un vacío en este tipo de investigaciones, que pueden ayudar a realizar un seguimiento nutricional de madres lactantes en otras regiones y en otros entornos a nivel latinoamericano.

Agradecimientos. Este trabajo se ha realizado haciendo uso de la infraestructura del Grupo de investigaciones Mellitopalinológicas y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos, de la Facultad de Ciencias en la Universidad del Tolima. A las madres donantes y al personal médico y paramédico de los hospitales de San Roque (Alvarado), San Vicente Paul (Fresno), San José (San Sebastián de Mariquita) y Santa Bárbara (Venadillo), Tolima Colombia. A los evaluadores del artículo y colaboradores permanentes de la revista Chilena de Nutrición por las observaciones en el proceso de arbitraje.

BIBLIOGRAFÍA

- Castellote C., Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano F., Castell M., Moreones M., Lopez-Sabater M., Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk, *J. Nutr* 2011; 141(6): 1181-1187.
- Tijerina-Saenz A, Innis A, Kitts D. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition, *Acta Paediatr* 2009; 98(11): 1793-1798.
- Ballard O, Morrow A, Human milk composition: nutrients and bioactive factors, *Pediatr Clin North Am* 2013; 60(1): 49-74.
- Sisk P, Lovelady C, Dillard R, Gruber K, O'Shea T, Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants, *J. Perinatol* 2007; 27(7): 428-433.
- Brahm P, Valdés V, The benefits of breastfeeding and associated risks of replacement with baby formulas, *Rev Chil Pediatr* 2017; 88(1): 7-14.
- Lee S, Kelleher S, Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 311(2): E405-E422.
- Ruiz L, Espinosa-Matos J, García-Carral C, Manzano S, McGuire M, Meehan C, McGuire M, Williams J, Foster J, Sellen D, Kamau-Mbuthia E, Kamundia E, Mbugua S, Moore S, Kvist K, Otoo G, Lackey K, Flores K, Pareja R, Bode L, Rodríguez J, What's Normal? Immune profiling of human milk from healthy women living in different geographical and socioeconomic settings, *Front Immunol* 2017; 8: 696.
- Prentice P, Ong K, Schoemaker M, Van E, Vervoort J, Hughes I, Acerini C, Dunger D, Breast milk nutrient content and infancy growth, *Acta Paediatr* 2016; 105(6): 641-647.
- Sunaric S, Denić M, Lalić J, et al. Physicochemical and biochemical parameters in milk of serbian breastfeeding women, *Turkish J Med Sci* 2017; 47(1): 246-251.
- Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, Torres E, Vento M. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk, *Matern Child Nutr* 2012; 10(3): 373-382.
- AlHeida S, Dórea J, Quality control of Banked milk in Brasília, Brazil, *J Hum Lact* 2006; 22(3): 335-339.
- Chaturvedi P, Warren C, Altaye M, Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation, *Glycobiology* 2001; 11(5): 365-372.
- Khan S, Hepworth A, Prime D, Lai C, Trengove N, Hartmann P, Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours, *J Hum Lact* 2013; 29(1): 81-89.
- O'Neill E, Radmacher P, Sparks B, Adamkin D, Creamatocrit analysis of human milk overestimates fat and energy content when compared to a human milk analyzer using mid-infrared spectroscopy, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56(5): 569-572.
- Ahrné S, Lönnemark E, Wold A, Aberg N, Hessel-Har B, SaaLHan R, Strannegård I, Molin G, Adlerberth I, Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish, *Microbes and Infection* 2005; 7(11-12): 1256-1262.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Rochat F, Chassard C, Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding, *Environ Microbiol* 2014; 16(9): 2891-2904.
- Cabrera R, Collado M, Laitinen K, SaLHinen S, Isolauri E, Mira A, The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery, *Am J Clin Nutr* 2012; 96(3): 544-551.
- Vanegas M, González L, Arévalo S, Antibiotic activity of

- Bifidobacterium* sp. isolated from breast milk and newborn faeces, against the main causes for foodborne illnesses, *Infectio* 2010; 14(4): 241-247.
19. Song S, Tian Q, Tong L, Pan M, Ma S, Novel method to determine the lipid content of breast milk. *Chemosphere* 2017; 168: 279-283.
 20. Çatli C, Dündar N, Dündar B, Adipokines in breast milk: An Update, *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014; 6(4): 192-201.
 21. Pinheiro P, Sousa R, Silva J, Monitoring the quality of human milk distributed by a reference milk bank, *J Pediatr* 2009; 69(3): 1- 48.
 22. Echeverry J, Jaramillo G, Restrepo L, Comparative evaluations of two diagnose methods for mastitis in a dairy herd from the Antioquia province, *Rev. Lasallis Invest* 2010; 7(1): 49-57.
 23. López A, Proteins in human milk, *Breastfeed Rev* 2007; 15(1): 5-16.
 24. Jareño E, Gormaz M, Silvestre D, Effect of human milk storage on their antioxidant activity, *Acta Pediat Español* 2014; 72: 239-243.
 25. Vázquez C, Villa M, Álvarez C, et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Follin-Ciocalteu method. *Food Chem* 2015; 176: 480-486.
 26. LaTuga S, Stuebe A, Seed P, A review of the source and function of microbiota in breast milk, *Semin Reprod Med* 2014; 32(1): 68-73.
 27. Fernández L, Rodríguez M, Bacterias lácticas de la leche humana, Red Española de bacterias lácticas, Documento técnico Universidad Complutense de Madrid, 1-12. <http://redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/leche%20materna%20red%20BAL.pdf>
 28. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM, Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real time PCR, *Lett Appl Microbiol* 2009; 48: 523-528.
 29. Pascual MR, Calderon V, Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas, 2da edición, Editorial Díaz de Santos, 2000; 429.
 30. Forero Y, Hernández A, Morales G, Breastfeeding and complementary feeding in a group of children participating in a comprehensive service program in Bogotá, Colombia, *Rev Chil Nutr* 2018; 45(4): 356-362.