**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LEITE
HUMANO DE BANCO DE LEITE E ESTUDO DOS
EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO A
7°C E 35°C SOBRE POPULAÇÃO DE *ESCHERICHIA
COLI* INOCULADA**

PATRICIA DE AQUINO RODRIGUES

Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. ERNANI PORTO

Dissertação apresentada a Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências, Área de Concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Julho - 2005

ERRATA

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

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
03	01	Este trabalho tem por objetivo:	Este trabalho teve por objetivo:
03	02	Caracterizar a microbiota do Leite Humano cru.	Analisar a qualidade microbiológica do leite humano cru.
24	01	Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no Leite Humano	Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no leite humano “ <i>in natura</i> ”
25	01	Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no Leite Humano	Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no leite humano “ <i>in natura</i> ”
27	02	Novak et al., 2000	Novak et al., 2000 a
27	08	Novak et al., 2000	Novak et al., 2000 b
32	11	6 amostras	7 amostras
32	07	estéril	Sem crescimento
32	08	5.1.6. Caracterização x acidez	Desconsiderar discussão
36	28	Tabela 7	Tabela 6
42	02	As bactérias mais frequentemente isolados no LH foram os microrganismos...	Os microrganismos mais frequentemente isolados no leite humano foram as bactérias aeróbias mesófilas...
42	06	A população de <i>Staphylococcus coagulase +</i> em 5% ficou...	A população de <i>Staphylococcus coagulase +</i> em 5% das amostras ficou...
42	17	O LH foi capaz de reduzir a população de <i>E. coli</i> em 1 ciclo log em 4 dias de armazenamento a 7°C, mostrando capacidade de inibição mesmo após pasteurizado.	A população de <i>E. coli</i> inoculada no leite humano reduziu-se em 1 ciclo log em 4 dias de armazenamento a 7°C.
43	04	A população de <i>E. coli</i> inoculada no LH sofreu redução de 3,8 ciclos log no processo de pasteurização rotineiro (62,5°C/ 30 min), oferecendo garantias de segurança para o produto.	A população de <i>E. coli</i> inoculada no leite humano sofreu redução de 3,8 ciclos log no processo de pasteurização rotineiro (62,5°C/ 30 min).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rodrigues, Patrícia de Aquino

Caracterização microbiológica de leite humano de banco de leite e estudo dos efeitos da pasteurização e armazenamento a 7° C e 35° C sobre população de *Escherichia coli* inoculada / Patrícia de Aquino Rodrigues. - - Piracicaba, 2005. 54 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. Bibliografia.

1. Aleitamento materno 2. Análise de alimento 3. Conservação de alimento por refrigeração 4. Banco de leite 5. *Escherichia Coli* 6. Leite humano 7. Microbiologia de alimento 7. Pasteurização I. Título

CDD 612.644

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO,

E mais esta etapa vencida
aos meus pais José e Ivete que
com carinho e sabedoria puderam
me proporcionar mais esta conquista!
Meu eterno amor e gratidão!

Ao meu noivo Luiz Fernando que
soube entender os momentos de
ausência devido às responsabilidades
que esta pesquisa impôs e com seu
amor sempre amenizou minha
ansiedade;

À minha avó Alice e tia Silvinha
que em Piracicaba foram meu
“porto seguro” e fonte de amizade;

À todos os meus familiares que
direta ou indiretamente sempre
estiveram ao meu lado me
incentivando.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr Ernani Porto, pelo exemplo de dedicação e amizade, aliado ao profundo conhecimento científico que direcionou e tornou possível esta pesquisa.

As estagiárias e amigas Juliana Aparecida Battistella Berti, Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin, Vanessa Cristina Nogueira e Ligia Dozena Domingos pela extrema dedicação e comprometimento com esta pesquisa;

A Cleomar Maria de Carvalho pela paciência e ajuda mesmo quando meus horários ultrapassavam seu período de trabalho;

A todos do laboratório de laticínios do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, que mais do que colegas de trabalho se tornaram pessoas muito queridas.

Ao Banco de Leite do HCFMRP que gentilmente cedeu as amostras para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Composição do Leite Humano.....	4
3.2 Leite Humano comparado ao leite bovino e fórmula infantil.....	7
3.3 Microbiologia do Leite Humano.....	8
3.4 O Banco de Leite Humano- BLH.....	10
3.5 Procedimentos tecnológicos : pasteurização e refrigeração.....	11
3.6 Controle físico-químico do Leite Humano no Banco de Leite.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 Amostragem.....	15
4.2 Caracterização microbiológica inicial do leite coletado.....	16

4.2.1	Contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i>	16
4.2.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (+).....	17
4.2.3	Contagem global de microorganismos aeróbios totais.....	18
4.2.4	Ensaio de pasteurização do leite <i>in natura</i>	18
4.3	Ensaio do efeito da pasteurização e armazenamento a 7°C e 35°C sobre <i>E. coli</i>	19
4.3.1	Seleção e preparo das amostras de leite.....	19
4.3.2	Obtenção e manutenção da cultura de <i>E. coli</i>	19
4.3.3	Curva de crescimento e contaminação das amostras.....	19
4.4	Ensaio com leite Humano inoculado com <i>E. coli</i> armazenado à 7°C e 35°C.....	20
4.4.1	Estocagem sob temperatura de 7°C.....	20
4.4.2	Estocagem sob temperatura de 35°C.....	20
4.4.3	Ensaio de pasteurização do leite contaminado com <i>E. coli</i>	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	Caracterização.....	22
5.1.1	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	26
5.1.2	Mesófilos aeróbios.....	28
5.1.3	Coliformes totais.....	29
5.1.4	<i>Escherichia coli</i>	30
5.1.5	Totalidade dos microorganismos encontrados no Leite Humano cru.....	31
5.1.6	Caracterização X acidez.....	32

5.2	Leite como Substrato.....	34
5.2.1	Armazenado a temperatura de 7°C.....	34
5.2.2	Armazenado temperatura de 35°C.....	35
5.3	Pasteurização do Leite Humano.....	38
5.3.1	Efeitos sobre a microbiota natural do leite humano.....	38
5.3.2	Ensaio da pasteurização com população inoculada com <i>E. coli</i>	40
6	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
	ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Amostras de Leite Humano.....	14
2 Frequência de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em Leite Humano <i>in natura</i> UFC/ mL.....	27
3 Frequência mesófilos aeróbios em Leite Humano <i>in</i> <i>natura</i> UFC/mL.....	29
4 Frequência de coliformes totais em Leite Humano <i>in</i> <i>natura</i> NMP/mL.....	30
5 Frequência de <i>Escherichia coli</i> em Leite Humano <i>in</i> <i>natura</i> NMP/mL.....	31
6 Leite Humano como Substrato para <i>E. coli</i> armazenado à 7°C.....	35
7 Leite Humano como substrato para <i>E. coli</i> armazenado à 35°C.....	37
8 Eficácia da pasteurização frente a população de <i>E. coli</i> inoculada.....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
1	Contagens bacterianas e acidez (°D) no Leite Humano..... 24
2	Totalidade dos microorganismos encontrados no Leite Humano cru..... 32
3	Causas da rejeição do Leite Humano de acordo com os critérios de aceitação..... 33
4	Correlação positiva: rejeição do LH por acidez positiva e microbiologia positiva..... 33
5	Correlação negativa: aceitação do LH por acidez negativa e rejeição microbiológica positiva..... 34
6	Efeito da pasteurização (62,5°C/30 min.) sobre a microbiota natural do Leite Humano..... 39

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LEITE HUMANO DE BANCO DE LEITE E ESTUDO DOS EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO A 7°C E 35°C SOBRE POPULAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* INOCULADA

Autora: PATRICIA DE AQUINO RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. ERNANI PORTO

RESUMO

Foram analisadas 60 amostras de Leite Humano provenientes do Banco de Leite do HCFMRP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; quantificando-se a população inicial de *Staphylococcus coagulase*+, microrganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes totais e *Escherichia coli*. *Staphylococcus coagulase* + foi encontrado em 90% das amostras analisadas; destas 13,33% com contagens maiores que 1 a 9 UFC/mL, 41,67% com população entre 10 a 99 UFC/mL e 35% com contagem superior a 100 UFC/mL. Em apenas 10% das amostras de Leite Humano não foi detectado *Staphylococcus coagulase* +. A população de microrganismos mesófilos aeróbios em 41,66% das amostras encontrou-se uma população entre 10^3 UFC/mL e 10^4 UFC/mL, 1,67% teve uma população $>10^5$ sem ultrapassar 10^6 UFC/mL. No restante das amostras ou seja 50% das amostras a população ficou abaixo de 10^2 UFC/mL e em 6,67% não foi detectado microrganismos

mesófilos aeróbios. Coliformes totais foram isolados em 20% das amostras e *Escherichia coli* apenas em 13,33% com população máxima de 21 NMP/mL. Apesar de ser critério de condenação, a população deste grupo de microrganismos não foi elevada, revelando condições higiênico-sanitárias gerais satisfatórias nas amostras de Leite Humano. Não houve relação entre condenação das amostras por acidez Dornic e elevada população bacteriana. O processo de pasteurização do Leite Humano foi eficiente, reduzindo a população microbiana natural entre 2 a 3 ciclos logarítmicos UFC/mL. Em nenhuma amostra houve presença de *Staphylococcus* coagulase + ou coliformes após a pasteurização. A pasteurização do Leite Humano com inoculação de população conhecida 5.5 log UFC/mL apresentou redução de 3.8 ciclos log UFC/mL. Inoculando o leite pasteurizado com uma população de 10^3 e acompanhando seu desenvolvimento durante 8 horas a 35°C foi observado uma extensão de 3h na fase LAG, seguido de posterior desenvolvimento, denotando possível existência de fatores bacteriostáticos. A inoculação do leite com população de 7,2 log UFC/mL de *E. coli* e posterior armazenamento a 7°C/ 4 dias reduziu a população em 1 ciclo log UFC/mL.

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HUMAN MILK OF BANK OF MILK AND STUDY OF THE EFFECT OF THE PASTEURIZATION AND STORAGE 7°C AND 35°C ON POPULATION OF *ESCHERICHIA COLI* INOCULATED

Author: PATRICIA DE AQUINO RODRIGUES

Adviser: Prof. Dr. ERNANI PORTO

SUMMARY

60 samples of Human Milk proceeding from the Milk Bank of the Hospital of the Clinics of the College of Medicine of Ribeirão Preto - HCFMRP had been analyzed; quantifying its initial population of *Staphylococcus* coagulase +, microorganisms mesophilic aerobic totals, total coliforms and *Escherichia coli*. *Staphylococcus* coagulase + was found in 90% of the analyzed samples; of these 13,33% bigger counting with the 1 to 9 UFC/mL, 41,67% with population enters 10 to 99 UFC/mL and 35% with the higher counting 100 UFC/mL. In only 10% of the Human Milk samples was not detected *Staphylococcus* coagulase +. The population of microorganisms mesophilic aerobic in 41,66% of the samples met a population between 10^3 UFC/mL and 10^4 UFC/mL, 1,67% had a population of $> 10^5$ without exceeding 10^6 UFC/mL. In the remain of samples or either 50% of the samples the population was below of 10^2 UFC/mL and in 6,67% it was not detected microorganisms mesophilic aerobic. Total

coliforms had been isolated in 20% of the samples and *Escherichia coli* only in 13,33% with population maximum of 21 NMP/mL. Although to be conviction criterion, the population of this group of microorganisms was not raised, disclosing satisfactory general hygienically - sanitary conditions in the Human Milk samples. It did not have relation between convictions of the samples for Dornic acidity and raised bacterial population. The process of pasteurization of Human Milk was efficient, reducing the natural microbiologic population enters the 2 and 3 logarithmic cycles UFC/mL. In none sample had presence of *Staphylococcus coagulase* + or coliforms after the pasteurization. The pasteurization of Human Milk with inoculation of known population 5,5 log UFC/mL presented reduction of 3.8 cycles log UFC/mL. Inoculating the milk pasteurized with a population of 10^3 and following its development during 8 hours 35°C was observed an extension of 3h in phase LAG, followed of posterior development, denoting possible existence of bacteriostatics factors. The inoculation of milk with population of 7,2 log UFC/mL of *E.coli* and posterior storage 7°C/4 days reduced the population in 1 cycle log UFC/mL.

1 INTRODUÇÃO

O Leite Humano é o alimento ideal para o recém-nascido. Além das funções nutricionais, o leite materno apresenta grande riqueza de substâncias bioativas. Essas substâncias têm funções sobre o epitélio do intestino do recém-nascido, amadurecendo-o, têm funções imunológicas, local e sistêmica e, também, apresenta diversas substâncias antibacterianas que possuem a capacidade de inibir a ação das bactérias impedindo a adesão e colonização do epitélio intestinal por microrganismos indesejáveis.

Por outro lado, promove a colonização do intestino por *Bifidobacterium*, considerados microrganismos probióticos. Assim, o leite materno tem função ativa sobre bactérias e influencia diretamente a colonização intestinal do recém-nascido.

Por vários motivos muitas crianças são impossibilitadas de receber o leite de suas mães e, para atendê-las, existem os bancos de leite. Os bancos de leite são responsáveis por operacionalizar de maneira otimizada o excedente lácteo de doadoras e por executarem as atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do Leite Humano, para posterior distribuição. Em uma década, o Brasil experimentou uma expansão, nunca registrada na história, destas unidades de banco de leite. De pouco mais de uma dezena em 1985, o país conta com atualmente 150 unidades, graças aos esforços do Ministério da Saúde.

A Rede Nacional de Bancos de Leite Humano juntamente com a FIOCRUZ desenvolveu metodologias de controle sanitário rotineiras que são

seguras e sensíveis. Contudo a produção do leite segue o fluxograma tradicional de um produto, sofrendo muitas vezes coleta e armazenamento doméstico, seguidos de procedimentos tecnológicos tais como pasteurização e congelamento, mas que ainda são pouco estudados e conhecidos, como processo industrial, assim como as interações entre os microrganismos e o Leite Humano nestes processos

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo:

- 2.1 Caracterizar a microbiota do Leite Humano cru.
- 2.2 Avaliar a eficácia da pasteurização do Leite Humano, frente à população inicial naturalmente encontrada.
- 2.3 Avaliar a eficácia da pasteurização do Leite Humano sobre uma população conhecida de *E. coli*.
- 2.4 Estudar o Leite Humano como substrato para *E. coli* durante o armazenamento a 7°C e a 35°C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Composição do Leite Humano

Segundo Lonnerdal (2003), o Leite Humano contém uma extensa variedade de proteínas que fornecem um ótimo balanceamento de aminoácidos para os bebês. O conteúdo médio de proteínas no Leite Humano no primeiro mês após o nascimento é de 1,3g/100 mL, mantendo-se de 1,13 a 2,07g/100mL de proteínas durante a lactação. No Leite Humano predominam proteínas do soro, como lactoalbumina e proteínas funcionais, como a lactoferrina e lisozima, com ação antibacteriana (Armond & Goldman, 1993). No leite bovino predomina a caseína, além de possuir um teor protéico mais elevado. As fórmulas derivadas do leite de vaca tentam corrigir isso, mas não possuem proteínas funcionais (Vinagre & Diniz, 2002). A caseína é um agrupamento de subunidades de proteínas, que formam micelas ligadas pelo cálcio e fósforo. As micelas do Leite Humano são menores e o coalho formado, mais tênue e mais frágil do que o de leite de vaca, o que reduz o tempo de esvaziamento gástrico e facilita a digestão (Vinagre & Diniz, 2002). No Leite Humano a caseína mais encontrada é a β -caseína, enquanto que a κ -caseína é o menor componente (Lonnerdal, 1985).

Uma característica do Leite Humano é sua diversidade de proteínas com atividade antimicrobiana tais como imunoglobulinas, oligossacarídeos, glicoproteínas, glicolípídeos, mucinas, lipases, lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase, as quais são resistentes às enzimas digestivas. São adaptados para persistirem no ambiente hostil durante o trânsito gastrointestinal; estes

compostos podem agir sinergicamente neutralizando e danificando bactérias impedindo a adesão e a colonização do epitélio intestinal por microrganismos indesejáveis e essa proteção ocorre sem provocar reações inflamatórias, por isso contribuem para a defesa de bebês na fase de amamentação (Goldman,1993; Palmero et al.,1999; Lonnerdal, 2003; Cleary, 2004).

Poder-se-ia sugerir que o leite é o veículo de uma comunicação entre o sistema imuno-maternal e o bebê; é um sistema ativo que dirige e que forma os sistemas imunes, metabólicos e da microbiota intestinal do bebê, a fim de proteger contra agentes de patógenos; desta forma o Leite Humano maduro, promove o desenvolvimento imune, facilita o desenvolvimento da tolerância e regula a resposta inflamatória dos bebês (Field, 2005). Segundo estudo de Lodinová-Zádníková et al. (1992), a administração de Leite Humano aos bebês prematuros e de risco teve um efeito muito favorável na redução do número de infecções e de mortes.

As imunoglobulinas são proteínas que facilitam a fagocitose, neutralizam as toxinas e os vírus e reduzem a adesão de bactérias às paredes das células epiteliais. Enzimas como lactoperoxidase inibem o desenvolvimento de muitas espécies bacterianas como *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, já a lisozima age atacando a parede bacteriana (Holmgren et al., 1981). Há, também a lactoferrina que tem ação bacteriostática (Ellison & Giehl, 1991). A lipase no Leite Humano é importante para a absorção da gordura e também tem função de proteção, destruindo protozoários como a *Giardia lamblia*. (Schanler, 1989). A IgA protege a mucosa intestinal, neutralizando toxinas e fatores de virulência, além de inibir a aderência de *Escherichia coli* nas células das mucosas intestinais (Goldman et al., 1986; Ogundele,1997; Noguera - Obenza et al., 2003). As proteínas do leite materno também promovem a colonização do intestino por bactérias probióticas como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, o que limita a instalação e o crescimento de microorganismos patogênicos (Lonnerdal,

2003; Shan, 1997). Essas proteínas biologicamente ativas também têm ação sistêmica (Hoerr & Bostwick, 2000).

O principal carboidrato presente no Leite Humano é a lactose (70%) e o restante está sob a forma de polissacarídeos com bioatividade específica e funções de proteção para o bebê. A lactose encontra-se numa concentração média de 6 % a 7 % no leite maduro e de 4% no colostro. Os oligossacarídeos são carboidratos adicionais com cerca de 1,3% no Leite Humano, porém, só são encontrados traços no leite de vaca. Esses elementos apresentam uma estrutura semelhante aos receptores bacterianos e bloqueiam a adesão de bactérias na membrana celular (Vinagre & Diniz, 2002).

A gordura do Leite Humano é o componente de maior variação. Sua concentração é alterada pelo tempo de gestação, período de lactação, hora da mamada, e de pessoa para pessoa. Além disso, sua qualidade varia conforme a alimentação materna. As mucinas contidas nos glóbulos de gordura do leite materno impedem que fímbrias bacterianas possam se aderir às células epiteliais da mucosa intestinal, favorecendo a defesa (Rudolff & Kunz, 1997).

Em bebês prematuros há evidências de que o Leite Humano reduz a incidência de infecções e diarreias toxigênicas, enterocolite necrosante e desenvolvimento de alergias. Fatores específicos de crescimento e hormônios constituintes do Leite Humano são importantes aliados na maturação do intestino do recém nascido prematuro (Sheard & Walker, 1988). Enfim, o Leite Humano tem importante função antibacteriana sendo uma arma poderosa contra infecções no recém nascido, principalmente nos prematuros (Schanler & Hurst, 1994). A presença materna nas unidades de terapia intensiva auxilia a proteção das crianças contra infecções hospitalares. As mães ao entrarem em contato com os microorganismos hospitalares, ativam seu sistema imune com a produção de células e imunoglobulinas que, posteriormente, estarão presentes no leite, protegendo as crianças (Vinagre & Diniz, 2002).

Desta forma, sendo o Leite Humano um produto não estéril, o seu armazenamento prolongado afeta a integridade de vários de seus

componentes; há que se conhecer as tecnologias disponíveis a fim de preservar a bioatividade do Leite Humano ao mesmo tempo em que se armazena este leite de maneira segura e eficaz contra microorganismos indesejáveis (Randal et al., 1984).

3.2 Leite Humano comparado ao leite bovino e formula infantil

O leite bovino contém 3 a 4 vezes mais proteínas do que o Leite Humano (Franco, 2003), o que se reflete também nas fórmulas infantis. Este excesso de proteína eleva os níveis de uréia no sangue da criança, acarretando um estresse metabólico. O Leite Humano contém cerca de 20 a 25% de nitrogênio não protéico, contra 1 a 16% em fórmulas a base de leite bovino; este nitrogênio não protéico, além da uréia, desempenha um importante papel no crescimento e desenvolvimento infantil; a uréia representa 50% do nitrogênio não protéico no Leite Humano e de 27 a 65% em fórmulas infantis a base de leite de vaca (Rudolff & Kunz, 1997).

Nutricionalmente, a grande diferença entre o Leite Humano e o leite bovino está na composição, onde há o predomínio de α -caseína no caso do leite bovino e de proteínas do soro e β -caseína no Leite Humano. Além disso, há diferenças na composição e estrutura das proteínas, no que se refere aos pesos moleculares, isso acarreta grandes diferenças nutricionais e digestivas para o recém-nascido, mesmo quando alimentado com fórmulas, uma vez que estas são à base de leite bovino (Rudolff & Kunz, 1997). Também nestas, não há proteínas com ação biológica, estando ausentes no leite bovino ou foram perdidas durante o processo de tratamento tecnológico, devido à sua sensibilidade ao calor (Renner, 1989).

Segundo Ford et al. (1977), comparando-se ao Leite Humano, o leite de vaca é mais rico em lactoperoxidase, enquanto a presença de tiocinato e peróxido inibem bactérias e vírus. Porém, o Leite Humano é mais rico em lisozima um potente agente bactericida, contendo cerca de 39 mg/dl, enquanto que o de vaca contém 13mg/dl.

O Leite Humano apresenta taurina, que é um β -aminoácido com resíduos de enxofre, o qual atua na absorção de lipídios, a partir da conjugação com sais biliares. Segundo Butler (1989) e Hambraeus et al. (1989) as fórmulas infantis não apresentam taurina porque ela é removida do leite bovino pelo processamento. Lonnerdal (1985), em seus estudos cita que a lactoferrina no Leite Humano tem efeito bacteriostático “*in vitro*” sobre a *E.coli*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

A fórmula infantil à base de leite bovino ainda tem um agravante, devido à necessidade de seu preparo que deve ter uma diluição correta, aliada a uma higiene adequada quanto à água a ser utilizada, que pode ser uma grande via de contaminação por bactérias (OMS, 1981).

3.3 Microbiologia do Leite Humano

No Leite Humano comumente são encontradas bactérias como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Serratia*. Na quase totalidade das vezes, o mesmo microorganismo pode ser isolado no Leite Humano, na pele da mama e na pele do mamilo; com população bacteriana semelhante a do leite. Excetuando-se situações em que o leite ordenhado é mantido por tempo prolongado fora das condições ideais de temperatura, essas bactérias não costumam causar infecção ou doença no recém nascido (West et al., 1979).

O estudo de Carrol (1979), com 207 amostras de leite gotejado, mostrou que 3% das mesmas eram estéreis, 82% continham somente microorganismos comensais como *Staphylococcus coagulase negativo* e *Streptococcus viridans*. Em 15% cresceram bactérias potencialmente patogênicas sendo: 6% *Staphylococcus aureus*, 7% *enterobactérias* e 2% *Streptococcus* do grupo B.

Segundo Wills et al. (1982), a contagem microbiana do Leite Humano ordenhado, cru e doado é bastante elevada, embora a maioria das bactérias

represente a flora da pele, os organismos potencialmente patogênicos são freqüentemente isolados.

Segundo estudo de Siimes & Hallman (1978), para *Streptococcus viridans*, é tida como aceitável uma população de 10^7 UFC/mL e para *Staphylococcus coagulase negativa* uma população de 4×10^6 UFC/mL. Porém segundo portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – BRASIL (2005), a população de mesófilos aeróbios deve ser de no máximo 10^2 UFC/mL ; devendo ter ausência de *Staphylococcus coagulase positiva* e de coliformes fecais e totais.

Casos de transmissão de *Staphylococcus aureus* multiresistente que foi transmitido através do Leite Humano, por portadoras assintomáticas aos seus bebês foram apresentados nos estudos realizados por Novak et al. (2000), e Heikkila & Saris (2003). *Listeria monocytogenes* já foi isolada de leite materno, sendo considerada determinante de doença grave no recém nascido, fato relatado por Syabic-Vlahovic et al., (1988). Estes fatos reforçam a necessidade de se pasteurizar todo o leite dos bancos de leite, sobretudo aqueles destinados a alimentação de prematuros. Segundo Semba (2000), a mastite bacteriana em mães infectadas pelo HIV também aumenta significativamente o risco de transmitir o vírus para os bebês.

O controle de qualidade microbiológico do leite é feito com base nos microrganismos indicadores. O cultivo dos indicadores deve ser simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-positivos(Rede Nacional dos Bancos de Leite Humano/ Manual Técnico Fiocruz, 2005). De acordo com estes critérios, os melhores indicadores de contaminação de origem fecal, direta ou indireta, têm sido os coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli*. Em seus estudos Jay (1992), sugeriu que o grupo coliforme poderia ser utilizado como índice de contaminação fecal, uma vez que pode ser detectado mais facilmente que espécies de *Salmonella*. Assim, leite que contenha bactérias do grupo coliformes é inaceitável. Os coliformes são comumente utilizados como indicadores higiênico-sanitários no Brasil (BRASIL,

2005) e exterior (ICSMF, 1987). A partir da metodologia clássica descrita para coliformes no "Standard Methods for the Examination of Dairy Products", foi desenvolvida uma metodologia alternativa utilizada no manual técnico da Rede Nacional dos Bancos de Leite, juntamente com a FIOCRUZ, utilizado na rotina operacional dos Bancos de Leite Humanos. Por habitar comumente a pele e fossas nasais de humanos, o *S. aureus* também pode muitas vezes ser considerado um microrganismo indicador das condições de manipulação (ICSMF, 1987)

3.4 O Banco de Leite Humano - BLH

A partir de 1985, em uma ação conjunta realizada pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ- e o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno – PNIAM - teve início o desenvolvimento de um subprograma com vistas a promover uma expansão qualitativa e quantitativa dos bancos de Leite Humano no Brasil (Rego, 2002). A Rede Nacional de Bancos de Leite Humano é uma iniciativa do Ministério da Saúde, desenvolvida através da Secretaria de Políticas de Saúde (Área de Saúde da Criança e Aleitamento Materno) e da Fundação Oswaldo Cruz -Instituto Fernandes Figueira (Rego, 2002).

Um aspecto importante para obtenção do leite é a seleção das doadoras, a qual é realizada à partir do histórico, com referência particular às doenças infecciosas; e antes mesmo de aceitar definitivamente uma doadora, esta deve ser instruída quanto aos procedimentos de coleta, armazenamento, transporte deste leite e também na limpeza e desinfecção dos equipamentos envolvidos (Louvois, 1982).

A coleta do Leite Humano pode ser realizada no domicílio ou no próprio hospital, sendo encaminhado ao BLH, onde poderá ser armazenado após avaliação das amostras quanto à contaminação, crescimento de microorganismos e posterior tratamento ou não do leite conforme as necessidades dos diferentes locais que irão utilizar o produto (Balmer, 1992).

A contaminação do leite sempre foi uma preocupação para os BLH, principalmente quando as amostras são coletadas e armazenadas nas casas das doadoras. Pelo fato do Leite Humano não ser um alimento estruturado e não dispor de nenhum tipo de barreira física para impedir a penetração de contaminantes, seus fatores de proteção devem ser preservados para uma melhor proteção do lactente (Almeida, 1986). Nos bancos de leite, pode haver ainda contaminação por bactérias lipolíticas e proteolíticas, as quais podem trazer efeitos indesejáveis na conservação do leite (Lucas & Roberts, 1979).

A riqueza de nutrientes do Leite Humano o torna um excelente meio de cultura para microorganismos. Esta suscetibilidade é aumentada pela introdução da embalagem e manipulação do produto e, se considerarmos o grupo a que se destina: crianças altamente vulneráveis; devem ser adotadas as medidas preventivas e de controle requeridas em cada fase do processo, desde a ordenha até a distribuição fornecendo assim um produto seguro, inócuo e que cumpra sua função como alimento (Pires e Junior et al., 2000).

3.5 Procedimentos tecnológicos: pasteurização e refrigeração

A pasteurização, juntamente com o acondicionamento em recipientes estéreis, resulta em um produto livre de bactérias que mantêm muitas das suas propriedades imunológicas e outros fatores de proteção (Lucas & Roberts, 1979). Segundo descrição de Rego (2002) e Amiot (1991), trata-se de um tratamento aplicado ao leite, que visa a inativação térmica de 100% das bactérias patogênicas e 99% de sua microbiota saprófita, através do binômio tempo-temperatura de 62,5°C por 30 minutos ou equivalente, calculado de modo a promover a equivalência a um tratamento de 15D para inativação térmica da *Coxiella Burnetti*.

Por outro lado, Balmer & Wharton (1992), sugeriu o uso de 56°C /30 min, o que beneficiaria o conteúdo de fatores protetores do leite tais como as imunoglobulinas, lactoferrina, peroxidase e lisozima; Além de matar a maior

parte das bactérias provenientes da própria pele e vírus incluindo o HIV, que são inativados a 56°C por 30 minutos.

Balmer & Wharton (1992) Gibbs et al. (1977), verificaram que após a pasteurização do Leite Humano havia uma diminuição da atividade da IgA para 79% em relação a sua atividade inicial. A atividade da lisozima, no entanto, permaneceu em torno de 64% e os macrófagos, em torno de 78% do valor inicial. Carbonare et al. (1996), avaliou os efeitos dos diferentes tratamentos físicos sobre Leite Humano, tais como a pasteurização, liofilização e radiação por microondas até 45°C, onde o valor de proteínas foi mantido, mas a IgA foi reduzida para 43,1%. Assim, em seu estudo Hernandez et al. (1979), sugere que o congelamento em contraste com a pasteurização, pode também ser um meio para armazenamento do leite, sem que reduza notadamente a capacidade inibitória bacteriana do leite.

Segundo Balmer & Wharton (1992), o aquecimento sofrido pelo Leite Humano durante a pasteurização afeta seus fatores imunológicos e, além disso, é ineficaz quando está altamente contaminado por microorganismos e na destruição das toxinas produzidas. Conforme Björkstén et al. (1980), uma pasteurização inadequada pode não só destruir as propriedades benéficas do leite como, por isso, aumentar a suscetibilidade para contaminações bacterianas subseqüentes. Porém em seu estudo, Lucas & Cole (1990), analisaram bebês que desenvolveram enterocolite necrosante e este índice era de 6 a 10 vezes mais freqüente em bebês que foram alimentados somente com fórmulas, 3 vezes mais comum em bebês alimentados com fórmula e leite do peito misturado, e constatou-se que o leite materno pasteurizado foi tão protetor quanto o leite materno cru.

A refrigeração visa obter uma diminuição na taxa de crescimento bacteriano e deve ser de 4°C no mínimo. Qualquer variação na temperatura como, por exemplo, abertura da porta da geladeira, ciclos de degelo, localização dentro do equipamento pode propiciar um maior risco de crescimento bacteriano (West, 1979). Segundo Björkstén et al. (1980), na

refrigeração a 4°C não há crescimento bacteriano, já no intervalo de 6 a 8°C, bactérias Gram-negativas podem se adaptar às baixas temperaturas, multiplicando-se bem lentamente e vindo a constituir-se um risco para o crescimento de patógenos potenciais e deterioração do leite. A maioria dos bancos de leite recomenda um período de refrigeração máximo de 48 horas. Acima deste tempo, deve ser congelado ou pasteurizado (BRASIL, 1998).

O congelamento do leite é um procedimento que visa preservar a maioria dos seus componentes por períodos de tempo maiores, sob temperaturas de -5°C ou de -10°C (Williams & Pittard, 1981). Para Louvois (1982), não há evidências de nenhuma deterioração dos componentes imunológicos no leite armazenado por cerca de 3 meses a -20°C, porém um tempo maior de armazenamento pode resultar em mudanças físicas que precedem a coagulação assim que o leite for descongelado. De acordo com o Ministério da Saúde, (BRASIL, 1998), uma vez pasteurizado, o leite pode permanecer até 6 meses congelado nas condições e temperaturas adequadas.

3.6 Controle físico-químico do Leite Humano no Banco de Leite

Os indicadores físico-químicos para controlar a qualidade do Leite Humano ordenhado representam as características que definem o valor nutricional do Leite Humano ordenhado destacando-se, portanto, o teor de gordura e o conteúdo energético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de Leite Humano foram fornecidas pelo Banco de Leite do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram fornecidas 60 amostras.

Figura 1 – Amostras de Leite Humano

4.1 Amostragem

A pesquisa foi realizada em leite maduro (obtido a partir do 15º dia pós parto, em média). Foram fornecidas 60 amostras de 20 mL de Leite Humano cru, de diferentes doadoras com excedente de produção láctea. Esta quantidade de amostras e volume foi estipulada pelo Banco de Leite, isto se deve à reduzida quantidade de leite doada e, para a rotina do Banco de leite, já são retiradas muitas alíquotas para análise, assim um número maior de amostras ou volume prejudicaria a produção do banco de leite. As amostras de leite já haviam passado pelo teste de acidez °D no próprio banco de leite quando foram fornecidas; segundo Manual Técnico da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano - FIOCRUZ pipeta-se 1mL de Leite Humano cru para um tubo de ensaio de 5 mL, adicionando-se 1 gota de fenolftaleína alcoólica a 1% como indicadora do ponto de viragem da solução; e hidróxido de sódio 0,1 N; esta metodologia é utilizada para o controle físico-químico na rotina operacional dos Bancos de Leite Humano no país. O valor médio de acidez desenvolvida gira em torno de 3º a 4º D, podendo considerar-se como aceitáveis valores menores que 8⁰ D.

A amostra individual de 20 mL de leite foi acondicionada em frasco de vidro com tampa rosqueável esterilizado. Foram fornecidas 12 amostras por vez que eram transportadas ao laboratório da Escola Superior de Agricultura (ESALQ-USP) em Piracicaba, em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável (gelox), no período de no máximo 3 horas, com uma temperatura máxima de 4°C.

4.2 Caracterização microbiológica inicial do leite coletado

Foi realizada nas 60 amostras de Leite Humano *in natura* contagens de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva (+) e contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos.

4.2.1 Contagem de coliformes totais e *E.coli*

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, série de 3 diluições, conforme Downes & Ito (2001). A partir da amostra de leite, foram feitas duas diluições decimais em 9,0 mL em água salina-peptonada. Foram inoculados 1,0 mL de leite e diluições tantas quantas necessárias, totalizando a série de 3 diluições, em tubos contendo caldo LST Mug (Lauril Sulfato Triptose modificado com MUG- 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo, Merck) com tubos de Durham invertidos. A incubação foi a 35°C/ 24-48 horas em estufa bacteriológica (Fanem, mod 002CB). Foram considerados suspeitos os tubos com crescimento e produção de gás.

A confirmação de *E. coli* foi feita examinando-se os tubos sob luz ultra violeta (6 w e $\lambda = 365$ nm) em cabine escura. Os tubos com fluorescência azul foram considerados positivos, pois a *E. coli* hidrolisa o MUG, liberando 4-metilumbeliferona, que é um composto que exibe fluorescência verde azulada visível sob luz ultra violeta.

A confirmação dos coliformes totais foi feita a partir dos tubos suspeitos de LST-MUG (crescimento e produção da gás), transferindo-se uma alíquota com auxílio de alça microbiológica para tubos com caldo Verde-Brilhante (Merck) com tubo de Durham invertido e incubados a 35° C/24-48 h em estufa bacteriológica. A determinação do número mais provável (NMP/mL) de ambos foi feita pela leitura em um tabela de Número Mais Provável (NMP) apropriada às diluições inoculadas (Silva et al., 1997).

4.2.2 *Staphylococcus coagulase positivo (+)*

Para contagem de *Staphylococcus coagulase positivo (+)* foi seguida a metodologia descrita por Downes & Ito (2001). Foi inoculado em duplicata 1,0 mL da amostra de leite em superfície, distribuído por 4 placas de ágar Baird-Parker (BP, Merck), previamente preparadas com solução salina de gema de ovo 50% mais 0,1% de telurito de potássio (Laborclin) e secas; sendo 3 com 0,3mL e uma com 0,1mL; espalhou-se o inóculo com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica (Fanem, mod 002CB).

Após incubação foi efetuada a contagem das colônias típicas: negras, pequenas, com halo translúcido ao seu redor e também as atípicas: não totalmente negras e sem halo ao seu redor, ambas foram contadas selecionadas para a triagem por coloração de Gram, teste de catalase e confirmação pelo teste de coagulase.

Na coloração de Gram foram consideradas as colônias que exibiram cocos Gram positivos arranjados em forma de cachos irregulares. No teste de catalase espalhou-se sobre lâmina de microscopia previamente flambada a colônia suspeita com auxílio de alça microbiológica e pingou-se uma gota de solução de H₂O₂ 3% e foram consideradas positivas as colônias com formação de borbulhas.

As colônias selecionadas para o teste da coagulase foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion - Infusão de Cérebro e Coração, Merck), incubados 35°C/ 24 horas. Feito isso, adicionou-se em um tubo de ensaio 0,2 mL da cultura obtida no caldo BHI com 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA (Laborclin), incubados a 37°C em banho-maria (Tecnal modelo TE 0541/E nº 1a), observando-se a formação do coágulo. O resultado foi expresso em UFC/mL, conforme o descrito por Downes & Ito (2001).

4.2.3 Contagem global de microrganismos aeróbios totais.

Seguindo metodologia descrita por Downes & Ito (2001) nas primeiras 35 amostras alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do leite foram inoculadas em profundidade em Plate Count agar-PCA (Merck), em duplicata e incubadas a 35°/48 h, foram consideradas para a contagem as placas que continham entre 25 e 250 colônias. A partir da amostra 36 devido ao aumento da contaminação foram feitas diluições decimais em água salina-peptonada até a diluição 10^{-3} e inoculadas em agar PCA, incubadas do mesmo modo. O resultado foi expresso em UFC/mL.

4.2.4 Ensaio de Pasteurização do leite *in natura*

Diferentes amostras de leite foram misturadas em frasco estéril, a fim de perfazer 100 mL, tendo um termômetro (calibrado pelo INMETRO). Esta amostra foi deixada em banho-maria (Marconi, mod. MAA 159) até atingir a temperatura de 62,5°C. A água do banho-maria ultrapassava a quantidade da amostra contida no frasco. Atingida a temperatura de 62,5°C era contado o tempo de 30 minutos, sendo que a cada 5 minutos o frasco era agitado a fim de evitar que a gordura se acumulasse na parte superior do frasco.

Terminado o aquecimento, os frascos eram submetidos a um resfriamento rápido, em banho-maria para resfriamento, contendo água, gelo e álcool, a fim de que o Leite Humano atingisse a temperatura entre 5 a 7 °C, finalizando assim o processo de pasteurização.

A contagem microbiana foi feita antes e após a pasteurização. Foram retiradas alíquotas de 1 mL e feitas diluições decimais em H₂O salina-peptonada, tantas quantas necessárias para a contagem microbiana. A contagem de *E. coli* foi feita conforme 4.2.1; enumeração de *Staphylococcus coagulase+* conforme 4.2.2 e a dos mesófilos aeróbios conforme 4.2.3.

4.3 Ensaio do efeito da pasteurização e armazenamento a 7° C e 35° C sobre *E. coli*.

4.3.1 Seleção e preparo das amostras de leite

O ensaio utilizou 100 mL de Leite Humano, obtido pela composição de diversas amostras. Foram excluídas aquelas em que a população bacteriana global inicial foi superior a 10^2 UFC/mL. A pasteurização foi preparatória para o ensaio do leite como substrato com armazenamento a 7°C e a 35°C.

4.3.2 Obtenção e manutenção da cultura de *E. coli*.

Foi utilizada a estirpe de *E. coli* ATCC 25.922 fornecida pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) / Laboratório de Microbiologia. Após o recebimento foi verificada a pureza da cultura através da coloração de Gram, crescimento em ágar Eosin Metilen Blue (EMB, Merck) e provas do Indol, Vermelho de metila, Citrato e Voges-Proskauer, conforme Downes & Ito (2001). A cultura estoque foi mantida em tubos com ágar nutriente inclinado, recoberto com vaselina estéril e mantido sob refrigeração a 4° C até o momento do uso.

4.3.3 Curva de crescimento e contaminação das amostras.

Para o cálculo da população dos ensaios com contaminação, foi construída, uma curva de crescimento para *E. coli*. A cultura estoque foi reativada por duas incubações sucessivas de 24h/35°C em tubos com Tryptic Soy Broth-TSB (Merck). Desta cultura assim reativada, 1,0 mL foi inoculado em 100 mL de TSB e incubado a 35° C. A cada hora era retirada uma alíquota de 1,0 mL, feitas diluições decimais em H₂O salina-peptonada, e semeadas em profundidade em ágar Tryptic Soy Agar-TSA (Merck), incubando-se 35°C /24-48 h e consideradas para a contagem as placas contendo entre 25 e 250 colônias.

A partir deste resultado foi construída a curva de crescimento (Anexo 1) utilizada para o cálculo da população inoculada no item 4.4

4.4 Ensaios com Leite Humano inoculado com *E. coli* armazenado a 7° e 35° C.

4.4.1 Estocagem sob temperatura de 7°C

Para o ensaio foi inoculada em 100 mL de Leite Humano previamente pasteurizado, uma população aproximada de 10^7 UFC/mL de *E. coli* obtida conforme 4.3.1. A amostra do leite foi preparada anteriormente e resfriada a 7° C em estufa BOD (Fanem modelo 346 CDG) no momento da inoculação, sendo a temperatura aferida em frasco de igual volume com termômetro no seu interior. Para evitar variações de temperatura o frasco de leite foi mantido dentro de vasilhame de água também a 7° C.

A amostra contaminada foi incubada a 7°C em estufa BOD, dentro de um frasco contendo água previamente resfriada a mesma temperatura; retirou-se alíquotas de 1mL a cada dia durante 4 dias. A partir da alíquota de 1 mL retirada, foram feitas diluições decimais conforme item 4.2.1. e a população de *E. coli* determinada pelo método dos tubos múltiplos em caldo LST-MUG, sendo a incubação, confirmação e contagem conforme 4.2.1.

4.4.2 Estocagem sob temperatura de 35°C

Para o ensaio foi inoculada em 100 mL de Leite Humano pasteurizado uma população aproximada de 10^3 UFC/mL de *E. coli* obtida conforme 4.3.1. O leite foi aquecido em Banho-Maria (BM; Tecnal modelo TE 0541/E nº 1) a 35° C previamente, sendo a temperatura de equilíbrio verificada em frasco com mesmo volume com termômetro no seu interior.

A amostra inoculada foi incubada a 35°C em BM, retirou-se alíquotas de 1mL a cada hora por 8 horas, A partir da alíquota de 1 mL retirada, foram feitas diluições decimais conforme item 4.2.1. e a população de *E. coli* determinada pelo método dos tubos múltiplos em caldo LST MUG conforme 4.2.1.

4.4.3 Ensaio de pasteurização do leite contaminado com *E. coli*

A contaminação do leite ocorreu como o descrito em 4.3.1, sendo inoculada uma população de cerca de 10^5 UFC/mL. O procedimento da pasteurização do leite inoculado com *E. coli* ocorreu conforme 4.3.2. A contagem foi feita antes e após a pasteurização. Foram retiradas alíquotas de 1 mL e feitas as diluições decimais em H₂O salina-peptonada, tantas quantas necessárias para a contagem de *E. coli*, que foi feita conforme 4.2.1

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização

Nas 60 amostras de Leite Humano *in natura* analisadas, pode-se constatar na Tabela 1, que *Staphylococcus* coagulase + foi o microrganismo mais freqüentemente isolado: 90% das amostras positivas. Muitas amostras apresentaram uma contagem algo elevada, atingindo até $1,3 \times 10^3$ UFC/mL. Essa alta freqüência de isolamentos pode ser explicada pelo fato do microrganismo ser habitante normal da pele e fossas nasais (Jay, 1992). Já os coliformes totais e *E. coli* não foram tão freqüentemente isolados. Os coliformes totais foram isolados em 20% das amostras analisadas, e destas apenas 13,33% confirmaram também a presença de *E. coli* (Tabela 1). A população máxima de coliformes totais foi de 110 NMP/mL e a de *E. coli* foi de 21 NMP/mL, as quais não foram tão elevadas quanto a de *Staphylococcus* coagulase +. Porém a legislação (Brasil, 1999) estabelece como padrão de referência a ausência tanto de *Staphylococcus* coagulase + uma vez que sua presença em alimentos pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo, além do que, este microorganismo produz toxinas, e uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar (Silva & Gandra, 2004). Esta mesma legislação (Brasil, 1999), também estabelece como padrão a ausência de microrganismos coliformes no Leite Humano de banco de leite e o leite cru deve ser devidamente pasteurizado para atender a essa exigência. O risco existente é a possibilidade da pasteurização eventualmente não lograr a eliminação da

presença destes microrganismos no leite. Observa-se na Tabela 1 que das 60 amostras, 56 (93%) foram positivas para mesófilos aeróbios e em somente 4 amostras não houve contagens. Essa alta frequência é considerada normal para essa classe de microrganismos, e a sua população máxima encontrada foi de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL, não sendo considerada elevada, de acordo com Silva & Almeida (2001).

Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no Leite Humano

AMOSTRA	° Dornic	Staphylococcus coagulase + UFC/mL	Mesófilos aeróbios UFC/ mL	Coliformes totais NMP/mL	<i>E. Coli</i> NMP/mL
1	10,0°	<1,0	2,3 x 10 ¹	15	2,3
2	10,0°	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3
3	10,0°	0,4x10 ¹	1,4x10 ¹	0,9	<0,3
4	10,0°	<1,0	0,1x10 ¹	<0,3	<0,3
5	10,0°	1,5x10 ¹	<1,0	<0,3	<0,3
6	3,0°	2,4x10 ²	4,8x10 ²	<0,3	<0,3
7	3,0°	1,0x10 ¹	>10 ²	46	<0,3
8	4,0°	0,7x10 ¹	0,5x10 ¹	<0,3	<0,3
9	5,0°	1,5x10 ¹	1,4x10 ³	<0,3	<0,3
10	5,0°	<1,0	5,0x10 ²	<0,3	<0,3
11	13,0°	0,1x10 ¹	2,0x10 ¹	<0,3	<0,3
12	3,0°	<1,0	1,9x10 ³	<0,3	<0,3
13	2,0°	3,8x10 ²	8,8x10 ²	<0,3	<0,3
14	1,0°	4,9x10 ²	8,4x10 ²	<0,3	<0,3
15	2,0°	<1,0	>10 ²	<0,3	<0,3
16	2,0°	7,4x10 ¹	4,1x10 ²	<0,3	<0,3
17	3,0°	3,8x10 ²	2,0x10 ²	<0,3	<0,3
18	2,0°	6,3x10 ²	2,3x10 ³	<0,3	<0,3
19	4,0°	0,6x10 ¹	1,3x10 ³	<0,3	<0,3
20	4,0°	0,1x10 ¹	<1,0	<0,3	<0,3
21	2,0°	8,4x10 ¹	>10 ²	<0,3	<0,3
22	2,0°	0,8x10 ¹	1,9x10 ²	<0,3	<0,3
23	4,0°	4,8x10 ²	>10 ²	<0,3	<0,3
24	4,0°	2,4x10 ¹	<1,0	<0,3	<0,3
25	2,0	1,3x10 ³	3,0x10 ³	<0,3	<0,3
26	7,0	3,9x10	3,1x10	<0,3	<0,3
27	4,0	2,7x10 ²	1,3x10 ³	<0,3	<0,3
28	2,0	>10 ²	2,0x10 ³	<0,3	<0,3
29	3,0	9,2x10	2,7x10 ²	110	<0,3
30	13,0	9,6x10	8,0x10	<0,3	<0,3

Tabela 1. Contagens bacterianas e acidez (°D) no Leite Humano

AMOSTRA	° Dornic	Staphylococcus coagulase + UFC/mL	Mesófilos aeróbios UFC/ mL	Coliformes totais NMP/mL	<i>E. Coli</i> NMP/mL
31	3,0	5,4x10	6,3x10 ²	<0,3	<0,3
32	4,0	3,6x10	1,8x10 ³	<0,3	<0,3
33	5,0	1,1x10 ²	2,4x10	<0,3	<0,3
34	4,0	9,2x10	>10 ²	0,9	0,4
35	4,0	8,5x10	2,3x10 ²	<0,3	<0,3
36	3,0	1,3x10 ²	1,3x10 ³	<0,3	<0,3
37	4,0	8,2x10	5,2x10 ⁴	<0,3	<0,3
38	5,0	1,8x10	2,9x10 ⁴	<0,3	<0,3
39	2,0	7,8x10	1,8x10 ³	<0,3	<0,3
40	4,0	1,1x10 ³	1,9x10 ⁴	<0,3	<0,3
41	1,0	1,3x10	3,6x10 ⁴	<0,3	<0,3
42	2,0	7,7x10	2,5x10 ⁴	>240	21
43	3,0	4,7x10 ²	3,5x10 ⁴	<0,3	<0,3
44	1,0	>10 ²	1,2x10 ⁴	>240	21
45	2,0	3,8x10	8,0x10 ³	<0,3	<0,3
46	3,0	1,2x10 ²	1,7x10 ³	<0,3	<0,3
47	4,0	3,7x10 ²	1,6x10 ³	4,3	0,4
48	5,0	5,1x10 ²	9,0x10 ³	<0,3	<0,3
49	5,0	1,1x10 ²	5,2x10 ³	<0,3	<0,3
50	6,0	1,2x10 ²	1,5x10 ⁴	110	15
51	3,0	3,8x10 ²	>10 ⁴	0,9	0,9
52	3,0	3,0x10 ²	1,9x10 ⁵	1,5	<0,3
53	7,0	4,8x10	7,9x10	<0,3	<0,3
54	3,0	5,0x10 ²	1,3x10 ²	<0,3	<0,3
55	3,0	6,7x10 ²	8,7x10 ²	<0,3	<0,3
56	1,0	5,2x10 ²	>10 ⁴	>240	0,7
57	1,0	4,1x10 ²	0,2x10 ⁴	<0,3	<0,3
58	4,0	1,0x10 ³	1,0x10 ⁴	<0,3	<0,3
59	5,0	9,1x10 ²	1,2x10 ⁴	<0,3	<0,3
60	6,0	3,2x10 ²	7,6x10 ²	<0,3	<0,3

5.1.1 *Staphylococcus coagulase positiva*

A presença constante de *Staphylococcus* nas amostras de Leite Humano pode ser explicada pela colonização da pele, dos seios, da cavidade nasal da doadora e do profissional de saúde ou alternativamente a condições insatisfatórias de utensílios empregados na ordenha (Novak et al., 2000; Heikkilä & Saris, 2003). Pelos dados obtidos, conforme a Tabela 1, a hipótese de colonização é a mais provável, visto que a qualidade microbiológica geral das amostras foi boa. Também, conforme se observa na Figura 2, a população do *Staphylococcus coagulase +* na maioria das amostras foi reduzida. Em 41,67% das amostras a população ficou entre 10 e 99 UFC/mL e em outras 13,3 % foi inferior a 10 UFC/mL.

Apesar de ser habitante normal da epiderme (Jay, 1992), contagens de *Staphylococcus coagulase+* acima de 10^2 UFC/mL em Leite Humano podem ser um indicativo de mastite (Novak et al., 2000). E números superiores a 10^2 UFC/mL de *Staphylococcus coagulase +* ocorreram em 35% das amostras analisadas. Fato semelhante ocorreu a West et al. (1979), que relatam em estudo ter encontrado *Staphylococcus* em 24% das amostras de leite cru de mães saudáveis; Pontes et al. (2003) encontraram *Staphylococcus* em 44,4% das amostras e também no estudo de Heikkilä & Saris (2003), onde a população de *Staphylococcus* foi de 64% do total de colônias.

A essas amostras dentro da faixa de 35% com população de *Staphylococcus coagulase +* superior a 100 UFC/mL, representam um risco potencial toxigênico no leite, assim como ser também um indicativo de mastite nas doadoras do banco de leite, ou representar problema de outra ordem como manipulação inadequada. Em outros 55% das amostras o microrganismo também foi isolado, porém com contagens menores do que 10^2 UFC/mL. E somente em 10% das amostras este microorganismo não foi detectado, como se observa na Figura 2.

A importância em se analisar este microorganismo está no fato de que ele é um produtor de toxina (Novak et al., 2000); e esta toxina continua presente no leite mesmo após a pasteurização visto que ela é termoestável, resistindo até mesmo a temperaturas altas como 100°C por 30 minutos; portanto a pasteurização de 62.5°C por 30 minutos que é a pasteurização usual utilizada em bancos de leite do Brasil poderiam eliminar os *Staphylococcus* existentes, porém, não eliminaria a toxina produzida; o que representaria um grande risco (Novak et al., 2000).

Figura 2 - Frequência de *Staphylococcus coagulase +* em Leite Humano *in natura* UFC/mL

5.1.2 Mesófilos aeróbios

A distribuição da frequência da população de mesófilos aeróbios nas amostras pode ser observada na Figura 3, onde 41,66% das amostras ficaram com população $>10^3$ a $>10^4$ UFC/mL considerada ligeiramente elevada no Leite Humano *in natura*; apenas 1 amostra (52) ou seja 1,67% do total de amostras atingiu a população de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL (Tabela 1). Porém nenhuma das amostras apresentou população $>10^6$ UFC/mL. Visto que é considerada natural uma população de até 10^5 UFC/mL, esta costuma ser a contagem máxima aceita para mesófilos antes da pasteurização (Louvois, 1982). Essas distribuições e contagens apresentadas neste estudo são melhores do que as verificadas no estudo de Silva & Almeida (2001), no qual 56,6% das amostras de Leite Humano tiveram contagens de mesófilos entre de 10^3 a 10^7 UFC/mL. Para Pontes et al. (2003), que encontraram mesófilos nestes números em 48,2%. Também no estudo realizado por Evans et al. (1978), onde 50% das amostras analisadas tiveram população de microrganismos aeróbios mesófilos igual ou superior a 10^6 UFC/mL. Isso é um indicativo de melhores procedimentos de ordenha e armazenamento no banco de leite em estudo, e que a alta incidência de *Staphylococcus* pode estar relacionada com o problema de colonização da pele das doadoras.

Figura 3 – Frequência de mesófilos aeróbios em Leite Humano *in natura* UFC/mL

5.1.3 Coliformes totais

Na Figura 4 observa-se a distribuição da população de coliformes totais em Leite Humano *in natura*. Somente em 20% das amostras foi detectada a presença desses microorganismos. Pelo critério adotado: presença/ausência pelos bancos de leite humano essas amostras seriam rejeitadas (BRASIL, 1998), indiferente da população. Um estudo realizado por Pontes et al.,(2003) detectaram a presença de coliformes totais em 33,3% das amostras analisadas. No presente estudo realizou-se a contagem da população para revelar a higiene desde a ordenha no domicílio, no transporte até ao banco de leite onde o leite é processado. Das amostras positivas, 5 amostras ou 8,33% apresentaram populações entre >100 a 999 NMP/mL (amostras: 29, 42, 44, 50 e 56). Os coliformes refletem a contaminação ambiental (Jay, 1992) e pode-se concluir que mesmo nas amostras positivas para coliforme totais, a higiene da coleta é

satisfatória, pois em geral, tanto a presença como a população encontrada foi baixa, e a grande maioria (80%) das amostras foi negativa.

Figura 4 – Frequência de coliformes totais em Leite Humano *in natura* NMP/mL

5.1.4 *Escherichia coli*

A Figura 5 mostra a distribuição de *E. coli* nas amostras de Leite Humano. Somente em 8 amostras (13,33%) houve detecção enquanto que Bjorkstén et al. (1980), encontraram *E. coli* em 12% das amostras de leite por ele estudadas assim como, Pontes et al.,(2003) que detectaram presença em 25,9% das amostras de leite analisadas. No presente estudo a maior população detectada foi de 21 NMP/mL, a qual pode ser considerada baixa. Esse microrganismo é um indicador de contaminação fecal e sua ausência na grande maioria das amostras demonstra que a qualidade sanitária do leite coletado foi boa

Figura 5 – Frequência de *Escherichia coli* em Leite Humano *in natura* NMP/mL

5.1.5 Totalidade dos microorganismos encontrados no Leite Humano cru

Na Tabela 2 podemos visualizar a distribuição dos microorganismos pesquisados, nas 60 amostras recebidas do banco de leite do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP); Carrol et al. (1979), em estudo com 270 amostras de Leite Humano cru verificaram que apenas 3% estava estéril, enquanto que 82% continham microorganismos comensais; 15% apresentaram desenvolvimento de microorganismos patógenos sendo 6% *Staphylococcus aureus* e 7% de *enterobactérias*.

No presente estudo, somente em 4 amostras (6,7%) não foram isolados microorganismos.

Tabela 2. Totalidade dos microorganismos encontrados no Leite Humano cru

Microorganismo	Amostra +	%
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	54	90%
mesófilos aeróbios	56	93,33%
coliformes totais	12	20%
<i>Escherichia coli</i>	08	13,33%
Estéril	4	6,7%

5.1.6 Caracterização x acidez

Os bancos de leite em sua rotina consideram como aceitáveis valores de acidez entre 1,0° e 8,0 °D (Brasil, 1998). Como pode ser observado na Tabela 1 em 6 amostras (1, 2, 3, 4, 5, 11 e 30) a acidez superou o valor de 8°D. Contudo, em nenhuma delas as contagens bacterianas foram elevadas o suficiente para justificar esse fato. A amostra 52, por exemplo, apresentou $3,0 \times 10^2$ UFC/mL de *Staphylococcus*, $1,9 \times 10^5$ UFC/mL de *mesofilos* aeróbios e 1,5 NMP de *Coliformes* totais com acidez baixa: 3,0 °D.

Utilizando-se os critérios de rejeição/aceitação do Leite Humano no banco de leite e conforme legislação vigente, temos os critérios de rejeição:

- Acidez maior que 8,0° D (Rede Nacional de bancos de leite / FIOCRUZ - 2005)
- Coliformes: presença (BRASIL, 2005).
- Staphylococcus* coagulase: presença
- Contagem de microorganismo mesófilos aeróbios: população acima de 10^2 UFC/mL antes da pasteurização já descarta o leite (BRASIL, 2005).

Correlacionando-se estes dados com o trabalho atualmente desenvolvido

Tabela 3. Causas da rejeição do LH de acordo com os critérios de aceitação

CAUSA	NÚMERO	%
Acidez	07	11,7
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	54	90
coliformes	12	20
mesófilos aeróbios	47	78,33

Como pode se observar na Tabela 3, o índice de rejeição das amostras por acidez foi reduzido, somente 11,7%, inferior à rejeição por coliformes e *Staphylococcus* coagulase +.

Tabela 4. Correlação positiva: rejeição do LH por acidez positiva e microbiologia positiva.

	Acidez + / Microrganismo +	Correlação	%
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	01/54	0.018	1.85
coliformes	02/12	0.16	16
mesófilos aeróbios	0/46	0	0

Pode-se observar na Tabela 4, onde se correlacionam o acerto entre a rejeição de acidez e microbiologia, que para microorganismos mesófilos aeróbios o índice de correlação foi zero. Nenhuma das amostras que foi rejeitada por acidez tinha populações elevadas. Para coliformes, também falhou em detectar sua presença com índice 0.1 de acerto, somente 2 amostras em 12. Para *Staphylococcus* coagulase + foi também muito baixa, apenas uma amostra houve coincidência, com correlação de 0,018. Considerando-se a alta frequência deste microrganismo no Leite Humano (54:60), a correlação é falha.

Tabela 5. Correlação negativa: aceitação por acidez negativa e rejeição microbiológica positiva.

	Acidez - / Microorganismo +	Correlação	%
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	51/54	0.94	94.4
coliformes	08/12	0.66	66
mesófilos aeróbios	47/47	1.00	100

Na Tabela 5 observa-se a correlação das amostras que seriam rejeitadas pela microbiologia, mas que foram aceitas pelo critério de acidez. Como se observa na Tabela 5, nenhuma das rejeições por microrganismos mesófilos foi detectada por acidez elevada. Para coliformes o índice foi 0,66 de modo que sua presença não influenciou na acidez. *Staphylococcus* coagulase positiva também não teve correlação.

5.2 Leite como substrato

5.2.1 Temperatura de 7°C

O Leite Humano, após a pasteurização, foi inoculado com uma população conhecida de *E. coli*: 7,2 log UFC/mL, baseando-se na curva de crescimento de *E. coli* previamente obtida (Anexo 1).

Na Figura 6 observa-se o comportamento desta população de *E. coli* durante o armazenamento a 7°C por quatro dias. Não houve proliferação e, pelo contrário, ocorreu uma redução de um ciclo logarítmico na sua população. No estudo de Bjorkstén et al. (1980), constataram que a síntese de proteína em organismos entéricos como a *E. coli* é paralisado quase que totalmente abaixo de 8°C. Os dados obtidos neste estudo parecem confirmar esta hipótese. Contudo, além de inibição, houve declínio da população e, segundo estudo de

Hernandez et al. (1979), isso se deve à atividade bacteriostática do Leite Humano, com participação da lactoferrina, inibindo o desenvolvimento de *Escherichia coli*.

Figura 6 – Leite Humano como substrato para *E.coli* armazenado a 7°C

5.2.2 Temperatura de 35°C

Na Figura 7, acompanhamos o desenvolvimento da *E.coli* ao longo de 8 horas a 35°C e podemos observar um prolongamento da fase lag, o que provavelmente se deve a atividade bacteriostática do Leite Humano (Mata & Wyatt, 1971; Goldman & Smith, 1973; West et al., 1979), e sendo uma população pequena, impediu o imediato desenvolvimento, porém, com a temperatura a seu favor, a população bacteriana transpôs tal barreira. Após iniciado o crescimento, observa-se que há um desenvolvimento exponencial a partir da 3ª hora, atingindo após 7 horas a fase estacionária.

Em estudo, Hernandez et al. (1979), compararam o desenvolvimento bacteriano a partir de um inóculo contendo 10^3 UFC/mL de *E. coli* inoculados em caldo de carne nutritivo, fórmula comercial e Leite Humano pasteurizado e todos alcançaram um desenvolvimento semelhante atingindo populações de no máximo 10^8 e 10^9 UFC/mL durante um período de 24 horas a temperatura de 35 a 37°C.

Como a maioria dos autores, Bjorkstén et al. (1980), também afirmam que a pasteurização a 62.5°C tem um índice aceitável de descontaminação e preserva algumas das propriedades bacteriostáticas do leite mesmo que as reduzindo. No presente estudo com o leite pasteurizado à temperatura atualmente utilizada pelos bancos de leite, este manteve parte de sua atividade bacteriostática, embora em quantidade mais reduzida e menos eficaz, ainda assim conseguiu inibir o desenvolvimento da *E. coli* por um período de 3 horas.

E esse desenvolvimento bacteriano alcançado, provavelmente se deu devido à perda que ocorre de IgA no Leite Humano pela pasteurização, a qual segundo Bjorkstén et al. (1980), seria de 33%, já com a IgM ocorre perda total, as perdas de lactoferrina 63%, de lisozima 23%, de macrófagos 22%; e ainda uma redução dos linfócitos de cerca de 61 células viáveis/mm³ antes da pasteurização para 0 células viáveis/mm³ após a pasteurização segundo concluiu estudo de Liebhaber et al. (1977).

Diversos estudos mostraram que as bactérias adicionadas ao leite pasteurizado crescem mais rapidamente do que as adicionadas ao leite cru; e, portanto, os microorganismos que escapam da pasteurização ou o contaminam posteriormente, crescem mais rapidamente quando o sistema bacteriostático do leite foi danificado (Gibbs et al., 1977; Ford et al., 1977; Hernandez et al., 1979; Bjorkstén, 1980). No presente estudo, haveria segurança após a pasteurização, uma vez que bactérias como *E. coli* e *Staphylococcus* foram eliminados nos ensaios realizados demonstrados na Tabela 7. Pelos dados obtidos, também não há demasiados riscos caso o leite seja resfriado rapidamente a 7°C ou

exposto acidentalmente por período curto à temperatura ambiente. Embora, evidentemente, essa prática deva ser evitada a todo custo.

Segundo preconizam Bjorkstén et al. (1980), uma pasteurização inadequada não somente pode danificar as propriedades benéficas presumidas do Leite Humano, mas pode também aumentar a suscetibilidade a proliferação bacteriana subsequente.

Figura 7 – Leite Humano como substrato para *E. coli* armazenado a 35°C

5.3 Pasteurização do Leite Humano

5.3.1 Efeitos sobre a microbiota natural do Leite Humano

O resultado da pasteurização realizada no Leite Humano está na Tabela 6; observa-se que a redução da população microbiana obtida, foi da ordem 2 a 3 ciclos logarítmicos e pode-se constatar que a pasteurização a 62,5°C por 30 minutos, foi eficaz. Em nenhuma das amostras pasteurizadas houve sobrevivência de *Staphylococcus* coagulase + ou de coliformes. Contudo, essa eficácia dependerá da população inicial no leite, visto que se for alta, o leite poderá estar impróprio para o consumo mesmo após o processo. Esses ensaios de pasteurização foram feitos para preparar o leite para o experimento de armazenagem a 7°C e a 35°C.

Tabela 6. Efeito da Pasteurização (62, 5° C/30 min) sobre a microbiota natural do Leite Humano.

Leite 1					Leite 2				
	<i>Staphylo</i> coagulase + UFC/mL	mesófilos aeróbios UFC/mL	coliformes totais NMP/mL	<i>E. coli</i> NMP/mL		<i>Staphylo</i> coagulase + UFC/mL	mesófilos aeróbios UFC/mL	coliformes. totais NMP/mL	<i>E. coli</i> NMP/mL
Antes Past.	1,9x10 ²	1,4x10 ²	<0,3	<0,3		<1,0	3,1x10 ⁴	46	<0,3
Pós Past.	<1,0	0,8x10 ¹	<0,3	<0,3		<1,0	0,2x10 ¹	<0,3	<0,3

5.3.2 Ensaio da pasteurização com população inoculada com *E.coli*

O Leite Humano, pasteurizado, foi inoculado com uma população conhecida 5.5 log UFC/mL de *E. coli*, baseando-se na curva de crescimento de *E. coli* previamente obtida (Anexo 1).

Na Figura 8 observa-se a redução obtida sobre a população de *E. coli* a qual foi bastante alta quase chegando a 4 ciclos log. Essa redução obtida confere boa margem de segurança, levando-se em conta a população de *E. coli* detectada no Leite Humano *in natura* (Tabela 1).

Segundo um estudo de Bjorkstén et al. (1980), a pasteurização utilizada atualmente de 62.5°C por 30 minutos não garante uma completa descontaminação, embora pareça eliminar as bactérias patogênicas; contudo os dados obtidos no presente estudo confirmam tal hipótese. De acordo com Tabela 6, haveria eliminação do grupo coliforme e *Staphylococcus* coagulase +. Embora o ensaio não tenha sido feito com esse microorganismo, sua termo-resistência não é muito diferente de *E. coli*. Alcançando a redução de 3.8 ciclos log, de acordo com a Tabela 6, apenas a população de microorganismos mesófilos aeróbios poderiam permanecer após o processo, mas mesmo assim, apenas em algumas amostras.

Figura 8 – Eficácia da pasteurização frente a população de *E. coli* inoculada

6 CONCLUSÕES

As bactérias mais freqüentemente isolados no LH foram os microrganismos aeróbios mesófilos (93,3%) e *Staphylococcus coagulase +* (90%), o que é compatível com o fato de constituírem a microbiota da pele e seios das doadoras.

A população de *Staphylococcus coagulase +* em 5% ficou entre 10^3 e 10^4 UFC/mL, a qual pode ser considerada elevada. Nas demais amostras (95%) a população foi compatível com a contaminação natural do leite humano.

As contagens de microrganismos mesófilos superaram 10^5 UFC/mL somente em uma amostra (1,67%). Todas as outras amostras apresentaram contagens inferiores, denotando boa qualidade do LH cru.

A qualidade higiênico sanitária do leite doado foi satisfatória, com 20,0 % das amostras positivas para coliformes totais e 13,33% para *E. coli*. A população detectada de *E. coli* máxima foi de 21 NMP/mL

Não houve correlação entre condenação por acidez e população elevada de quaisquer microrganismos estudados.

O LH foi capaz de reduzir a população de *E. coli* em 1 ciclo log em 4 dias de armazenamento a 7° C, mostrando capacidade de inibição mesmo após pasteurizado.

Incubado a 35° C o LH foi capaz de deter a proliferação de *E. coli* por 3 H, após o que o microrganismo passou a desenvolver-se normalmente, aumentando a população em 5 ciclos log em 5 H.

A pasteurização do LH foi eficaz sobre a microbiota natural do leite, tornando o produto seguro.

A população de *E. coli* inoculada no LH sofreu redução de 3,8 ciclos log. no processo de pasteurização rotineiro (62,5° C/30 min), oferecendo garantias de segurança para o produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A.G. Controle microbiológico em bancos de Leite Humano.In: REUNIÃO MERCK SOBRE MICROBIOLOGIA HIGIENE MÉDICA E INDUSTRIAL., 4., Rio de Janeiro, 1986. 12p. **Resumo.** s.n.t.

AMIOT, J. **Ciência y tecnologia de la leche.** Zaragoza : Acribia, 1991.

ARMOND, S.; GOLDMAN, M.D. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating propertie. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.12, n.8, Aug. 1993.

BALMER, S.E.; WHARTON, B.A. Human milk banking at Sorrento maternity hospital. **Archives Disease Childhood**, v.67, p.556-559, 1992.

BJÖRKSTÉN, B.; BURMAN, L.G.; CHATEAU, P.; FREDRIKZON, B.; GOTHFORS, L.; HERNELL, O. Collecting and banking human milk: to heat or not heat?. **British Medical Journal**, v.281, p.765-769, Sept. 1980.

BRASIL. Consulta pública nº 5 , de 21 de Outubro de 1999. Dispõe sobre regulamento Técnico para princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.207, p.42-53, 28 de Out. 1999. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 48p.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº12, de 2 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para Alimentos**.
< <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/> (02 jun. 2005).

BUTLER, J.E, *In* **Micronutrients in milk and milk-based food products**. New York: Elsevier Science, 1989.

CARBONARE, S.B.; PALMEIRA,P.; SILVA,M.L.M.; SAMPAIO,M.C. Effect of microwave radiation, pasteurization and lyophilization on ability of human milk to inhibit *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells. **Journal Diarrhoeal Disease Research**, v.14, n.2, p. 90-94, Jun. 1996.

CARROL, L.; DAVIS, D. P.; OSMAN,M.; MC NEISH, A.S. bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. **The Lancet**, v.6, p. 732-733, Oct. 1979.

CLEARY, T. Human milk protective mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v.2004, n. 554, p.145-154, 2004.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association , 2001. 676p.

ELLISON, R.T.; GIEHL, T.J. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **Journal for Clinical Investigation**, v.88, p.1080-1091, Oct. 1991.

EVANS, T.J.; RYLEY, H.C.; NEALE, L.M.; DODGE, J.A.; LEWARNE, V. M. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. **Archives of Disease in Childhood**, v.53, p.239-241, 1978.

FIELD, C. J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **American Society for Nutritional Sciences**, v.135, n. 1, p.1-4, 2005.

FIOCRUZ. **Rede Nacional de bancos de leite humano**.
<http://www.fiocruz.br/redeblh> (02 jun. 2005).

FORD, J.E.; LAW, B.A.; MARSHALL, V.M.E.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **The Journal of Pediatrics**, v.90, n.1, p.29-35, 1977.

FRANCO, G.V.E. **Nutrição**: texto básico e tabela de composição química dos alimentos. 9. ed. São Paulo. Atheneu, 2003. 307p.

GIBBS, J.H.; FISHER, C.; BHATTACHARYA, S.; GODDARD, P.; BAUM, J.D. Drip breast milk: its composition, collection and pasteurization. **Early Human Development**, v.1, n.3, p. 227-45, 1977.

GOLDMAN, A.S.; SMITH, C.W. Host resistance factors in human milk. **Journal of Pediatrics**, v.82, p.1082-1090, 1973.

- GOLDMAN, A.S.; THORPE, I.W.; GOLDBLUM, R.M. HANSON, I.A. Anti-Inflammatory properties of human milk. **Acta Paediatric Scand**, v.75, p.689-695, 1986.
- GOLDMAN, A.S. The immune system of human milk: antibacterial, antiinflammatory and immunomodulating properties. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.12, n. 8, p.664-672, 1993.
- HAMBRAEUS, L.; FORSUN, E.; LONNERDAL, B. **Micronutrients in milk and milk-based food products** . New York: Elsevier Science, 1989.
- HEIKKILÄ, M.P; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the comensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.3, p.471-478, 2003.
- HERNANDEZ, J.; LEMONS, P.; LEMONS, J.; TODD, J. Effect of storage processes on the bacterial growth-inhibiting activity of Human Breast Milk. **Pediatrics**, v.63, n.4, p.597-601, 1979.
- HOERR, R.A.; BOSTWICK, E.F. Bioactive proteins and probiotic bacteria: modulators of nutritional health. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.711-713, 2000.
- HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, A.M.; AHERN, C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxigenic binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Infect Immunologic**, v.33, p.136-41, 1981.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS -ICMSF - **Microorganismos de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1987. 2v.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. New York: Avi Book, 1992. cap. 21, p. 510-540: Foodborne Listerioses.

LIEBHABER, M.D.; LEWISTON, N.J.; ASQUITH, M.T. OLDS-ARROYO, L. SUNSHINE, P. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. **Journal of Pediatrics**, v. 91, n. 6, p.897-900, 1977.

LODINOVÁ-ZADNÍKOVÁ, R.; BARTÁKOVÁ, Z. TLASKALOVÁ, H. The effect of oral colonization by non-pathogenic E-coli on the immune response in neonates and possibilities of its use in the prevention of nosocomial infections in children at risk. **Ceskoslovenska Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie**, v.42, n.3, p.126-132, Praga,1992.

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

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1537-1543, 2003.

LOUVOIS, J. Laboratory monitoring of banked human milk. **Medical Laboratory Sciences**, v.39, p.311-318, 1982.

LUCAS A.; COLE, T. J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. **Lancet**, v. 336, p. 1591-1523, 1990.

LUCAS, A.; ROBERTS, C.D. Bacteriological quality control in human milk-banking. **British Medical Journal**, v.1, p.80-2, 1979.

MATA, L.J.; WYATT, R. G. Host resistance to infection. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.24, p.976-986, 1971.

NOGUERA-OBENZA, M.; OCHOA, T.J.; GOMEZ, H.F.; GUERRERO, M.L.; HERRERA-INSUA, I. MORROW, A.L.; RUIZ-PALACIOS, G.; PICKERING, L.K.; GUZMAN, C. A.; CLEARY, T.G. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.545-551, May. 2003.

NOVAK, F.R.; DA SILVA, A.V.; HAGLER, A.N.; FIGUEIREDO, A.M. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. **Journal Medical Microbiology**, v.49, p.1109-1117, 2000.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; WARNKEN, M. B.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; HANGLER, A. N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.1, p.29-33, jan./fev. 2000.

OGUNDELE, M.O. Complement-mediated bactericidal activity of human milk to a serum-susceptible strain of *E. coli* 0111. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.689-696, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS - **Código internacional de comercialização de substitutos do leite materno**. Genebra: WHA, 1981. (WHA 34:22).

PALMERO, R. M.; BERTHOLD, K.; KUNZ, C.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk: II. **Clinics in Perinatology**, v.26, n.2, 1999.

PIRES JUNIOR, A.J; PEIXOTO, M.M.L.V.; OLIVEIRA, S.M. Controle de Qualidade microbiológico. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEITE HUMANO; CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1., natal, 2000. **Resumo**. s.n.t.

PONTES, M.R.A. IVASAKI, Y. OLIVEIRA, Y.S. Avaliação das condições higiênico sanitárias do Leite Humano pasteurizado distribuído pelo banco de Leite de um Hospital público do Distrito Federal. **Higiene Alimentar**, v.17, n.107, p.43-49, abr. 2003.

RANDALL, M.; DILL, C. W.; ALBRECHT, T. B.; ALFORD,E.S.; GARZA,C.; GOLDMAN, A. Rapid high-temperature treatment of human milk. **The Journal of Pediatrics**, v.104, n.3, p.380-385, 1984.

REGO, J.D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. 518p.

RENNER, E. **Micronutrients in milk and milk-based food products**. Cambridge: Elsevier Applied Science, 1989.

RUDOLFF, S.; KUNZ, C. Protein and nonprotein nitrogen components in Human milk, bovine milk, and infant formula: Quantitative and qualitative aspects in infant nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.24, p.328-344, 1997.

SEMBA, R.D. **Mastitis and transmission of human immunodeficiency virus through breast milk**. New York: Academy of Sciences, v. 918, p.156-62, 2000.

SCHANLER, R.J.; Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. **Seminars in Perinatology**, v.13, p.69-77, Apr. 1989.

SCHANLER, R.J.; HURST, N.M. Human milk for the hospitalized preterm. **Seminars in Perinatology**, v.18, n.6, p.476-84, 1994.

SHAN, N.P. *Bifidobacteria*: characteristics and potential for application in fermented products. **Michwissenschaft**, v.52, n.1, p.16-20, 1997.

SHEARD, N.F.; WALKER, A. The role of breast milk in development of the gastrointestinal tract. **Nutrition Reviews**, v.46, n.1, Jan. 1988.

SIIMES, M.A.; HALLMAN, N.J. A pespective on human milk banking. **The Journal of Pediatrics**, v.94, p.173-174, 1979.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, V.G.; ALMEIDA, J.A.G. Crescimento Bacteriano em Leite Humano ordenhado In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE HUMANO, Ribeirão Preto, 2001. **Resumo**. s.n.t.

SILVA, W. P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p.32-40, Jul. 2004.

SYABIC-VLAHOVIC, M.; PANTIC, D.; PAVICIC, M. Transmission of *Listeria monocytogenes* from mother's milk to her baby and to puppies. **Lancet**, v.2, p.1201, 1988.

VINAGRE R.D.; DINIZ , E.M.A. **O Leite humano e sua importância na nutrição do recém nascido prematuro** . São Paulo: Atheneu, 2002.

WEST, P.A.; HEWITT, J.H.; MURPHY, O.M. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v.1, p.269-77, 1979.

WILLIAMS, F.H.; PITTARD, W.B. Human milk bank: practical concern for feeding premature infants. **Journal of the American Dietetic Association**, v.79, n.5, Nov. 1981.

WILLS, M.E.; HAN, V.E.M.; HARRIS, D.A.; BAUM, J.D. Short-time low-temperature pasteurization of human milk. **Early Human Development**, v.7, p.71-80, 1982.

ANEXOS

Anexo 1 – Curva de Crescimento de *E. coli*