Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Estudo dos fatores que condicionam acidez
elevada em Leite Humano: aspectos microbiológicos e nutricionais**

Isis Sabrina Scarso

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2008

Isis Sabrina Scarso
Tecnóloga em Saúde

**Estudo dos fatores que condicionam acidez
elevada em Leite Humano: aspectos microbiológicos e nutricionais**

Orientador: Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2008

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

Scarso, Isis Sabrina

Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em Leite Humano: aspectos microbiológicos e nutricionais / Isis Sabrina Scarso. -- Piracicaba, 2008.
83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Acidez 2. Leite humano -- Qualidade 3. Microbiologia de alimentos 4. Nutrição da mãe I. Título

CDD 612.644
S287e

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

Aos meus pais Ivan Roberto Scarso e
Elide Sefiza Simões Scarso
por todo amor, apoio e incentivo.

A minha irmã Marcela Emanuele Scarso
pela motivação, amor e auxílio,

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou meus passos em mais uma etapa de minha vida e sem Ele nada teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Ernani Porto, pela orientação, ensinamentos e confiança.

À Prof. Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca, pela dedicação e orientação principalmente nas etapas deste trabalho relacionadas a nutrição.

À Prof. Dra. Elisabeth Pelosi Teixeira pela atenção, incentivo e colaboração para a melhoria deste trabalho.

À Denise Leme, pela amizade e colaboração na etapa prática deste trabalho.

À Nicolle Ferraz de Arruda, pela disponibilidade (principalmente aos sábados), interesse e dedicação nas etapas de análises laboratoriais.

Às meninas Cíntia (Bomba), Rebeca (Panqueca), Bruna (Caloria), Natália (Torcida), Marcela (Parmalat) e a Milla pela prontidão, amizade e colaboração nas análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Edwin Moises Marcos Ortega pela competência, didática e disponibilidade para me auxiliar nas análises estatísticas.

Aos amigos e funcionários do Instituto Adolfo Luz de Sorocaba que sempre estiveram dispostos a colaborar, em especial a Maria de Lourdes Burini Arine, Yara Solange Kubo Fonseca e Heloísa Gimenez Gil Dias, que sempre serão minhas mestras, pelo carinho, confiança e por estarem sempre presentes na minha vida pessoal e profissional. Muito obrigada!

Aos funcionários do Banco de Leite Humano de Sorocaba que prontamente colaboraram para a execução deste trabalho, principalmente as enfermeiras Fabiana e Mônica e aos colaboradores Eliana, Maria, Milena, Regina, Patrícia, Sueli e Natalina pela participação assídua.

A Enfª Eliane Alves dos Santos por ter me apresentado esse trabalho lindo e gratificante exercido pelos Bancos de Leite Humano do Brasil e pela motivação.

Aos funcionários do Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Regina, Amábile, Márcia, Bia, Gislaine, Rose que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas do Curso de Pós-graduação, Milla, Paula, Marina, Cristiane, André, Neila, Ingrid, Milena e em especial a Ana Cláudia Ribeiro Rossi pela convivência, companheirismo, angústias e alegrias compartilhadas.

Aos meus pais Ivan e Elide, a minha irmã Marcela e ao Rodrigo Carrara Ximenes pelo estímulo, compreensão, amor e por sempre estarem ao meu lado ouvindo minhas colocações e me aconselhando durante o mestrado.

A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para realização desta pesquisa.

A Empresa Chemyunion Ltda. pela oportunidade de trabalho e em especial a Daiane Maria Barros, Ana Paula Vilar pela compreensão e confiança depositadas. E aos colegas Vanessa, Marcus, Cristiane, Aristides, Daniela e Cristiano que de alguma forma colaboram comigo.

Aos meus amigos por quem tenho tanto carinho, Patrícia Antonio, Luciana Avancini, Cristiane C. A. Ferreira pelas longas conversas, conselhos e diversão.

A todos os meus amigos e familiares que puderam entender a minha ausência neste período de estudos e que me ajudaram, mesmo à distância, a conquistar esse sonho.

*“Aprender é a única
coisa que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1.1 Proteína.....	16
2.1.2 Lipídios	17
2.1.3 Carboidratos	18
2.1.4 Vitaminas.....	19
2.1.5 Minerais.....	20
2.2 Controle de Qualidade do Leite Humano	21
2.2.1 Funcionamento do Banco de Leite Humano	21
2.2.2 Controle de Qualidade Laboratorial.....	23
2.3 Análises Laboratoriais	24
2.3.1 Controle Microbiológico	24
2.3.2 Controle Físico-químico.....	31
2.4 Consumo de Alimentos	33
3 Material e métodos.....	35
3.1 Amostragem	35
3.2 Determinação da acidez.....	35
3.2.1 Recepção	35
3.2.2 Análise de acidez	36
3.3 Análise microbiológica.....	36
3.3.1 Recepção	36
3.3.2 Preparo da amostra.....	36
3.3.3 Pesquisa para coliformes totais e <i>E. coli</i>	37
3.3.4 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	38
3.3.5 Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbicos totais	39
3.3.6 Pesquisa de bactérias lácticas	39

3.4 Elaboração e aplicação do questionário de consumo alimentar.....	40
4 Resultado e discussão	43
4.1 Dados microbianos.....	43
4.1.1 Pesquisa de bactérias do grupo coliformes.....	51
4.1.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	54
4.1.3 Microrganismos Mesófilos Aeróbios Totais	56
4.1.4 Bactérias lácticas	62
4.1.5 Bactérias lipolíticas.....	64
4.2 Dados de consumo de alimentos	65
5 CONCLUSÃO.....	72
6 REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE I.....	78
APÊNDICE II.....	80
ANEXO.....	83

RESUMO

Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em leite humano: aspectos microbiológicos e nutricionais

Foram analisadas 72 amostras de leite humano cru recebidas do Banco de Leite do Conjunto Hospitalar de Sorocaba, com valores de acidez conhecidos. Quarenta e oito delas tinham acidez aceitável (até 8° D) e outras 24 amostras com acidez acima desse limite. Foram realizadas contagens bacterianas: bactérias lácticas, lipolíticas, coliformes totais e fecais, microrganismos aeróbios mesófilos totais e *Staphylococcus* coagulase positiva. Quarenta e nove questionários de frequência alimentar foram aplicados em lactantes doadoras de leite com o propósito de estabelecer correlação entre microbiologia, acidez e nutrição das lactantes. Nas amostras com valor de acidez $\leq 8^{\circ}\text{D}$ as populações microbianas encontradas foram: para o grupo dos microrganismos mesófilos aeróbios totais e bactérias lácticas a população máxima encontrada ficou na ordem de 10^6 UFC/mL. Já para bactérias lipolíticas este valor não ultrapassou $1,9 \times 10^5$ UFC/mL. Os coliformes totais foram isolados em 47,2% (34 amostras) das amostras analisadas, destas 87,5% confirmaram também a presença de *E.coli*. Para *Staphylococcus* coagulase positiva o valor máximo encontrado foi 1×10^4 UFC/mL e foi similar às amostras ácidas e não ácidas. Nas amostras rejeitadas (acidez $\geq 8^{\circ}\text{D}$) as contagens máximas tanto para o grupo de mesófilos como de bactérias lácticas foram da ordem 10^7 UFC/mL. As bactérias lipolíticas foram encontradas em 53,52% (13 amostras) do total de amostras analisadas e o grupo dos coliformes foi detectado em 52,94% das amostras ácidas, destas 33,33% apresentaram crescimento de *E. coli*. Os dados foram avaliados pela correlação de Pearson entre as variáveis: população de microrganismos mesófilos aeróbios totais e acidez Dornic. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$. Os valores de acidez Dornic não mostraram correlação ($R = 0,215$) estatisticamente significativa com a população de microrganismos mesófilos aeróbios totais (UFC/mL) para as amostras analisadas. De acordo os dados nutricionais, pequenas diferenças são observadas em relação ao consumo de alimentos e alteração de acidez do leite humano. Pelos valores encontrados não foi possível detectar correlação entre a nutrição da lactante e os valores de acidez encontrados nas amostras de leite humano.

Palavras-chave: Acidez, Leite humano, Análise microbiológica, Aspectos nutricionais

ABSTRACT

The study of the factors that condition high acidity in human milk: microbiological and nutritional aspects

Seventy two samples of human breastmilk obtained from the Milk of the Hospitals Group of Sorocaba were analyzed, prior to pasteurization. Dornic acidity was titrated in duplicate for each sample. Forty eight of them had acceptable acidity (up to 8° D) and other 24 samples with acidity above of that limit. Quantifying the initial population: lactic bacteria, lipolitics bacteria, total coliforms and *Escherichia coli*, aerobic mesofilic microorganisms and *Staphylococcus* positive coagulase. Forty nine questionnaires of alimentary frequency were applied in lactic donors of milk with the purpose of to detect correlation among microbiology, acidity and nutrition of the lactic ones. The samples with value of acidity <8°D the found populations of microorganism were: group of the microorganisms mesofilic total aerobic and lactic bacteria the found maximum population was 10^6 CFU/mL. Although for lipolitics bacteria this value did not cross $1,9 \times 10^5$ CFU/mL. The group of total coliforms were isolated in 47,2% (34 samples) of the analyzed samples, of these 87,5% they also confirmed the presence of *E.coli*. In *Staphylococcus* positive coagulase the detect maximum value was 1×10^4 CFU/mL and it was similar to the acid samples and no acid. In the samples with acidity above 8°D (rejected) the maximum population so much for the mesofilic group as of lactic bacteria they were 10^7 CFU/mL. The lipolitics bacteria were found in 53,52% (13 samples) of the total of analyzed samples and the group of the coliforms was detected in 52,94% of the acid samples, of these 33,33% they presented growth of *E. coli*. Data were analyzed to detect correlation between variables: population of aerobic mesofilic microorganisms and acidity Dornic, using Pearson's coefficient. The level of significance was set at $p < 0,05$. The values of acidity Dornic did not show correlation ($R = 0,215$) statistically significant with the population of aerobic mesofilic microorganisms (CFU/mL) for the analyzed samples. According to the data nutritional, small differences are noticed regarding to the consumption of foods and alteration of acidity of the human milk. For the found values it was not possible to detect correlation between the nutrition of the lactic and the values of acidity found in the samples of human milk.

Key words: Acidity, Human milk, Microbiological analyses, Nutritional aspects

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -- Fluxograma do processamento do leite em um BLH.....	21
Figura 2 – Distribuição da população de coliformes totais em leite humano cru	52
Figura 3 -- Distribuição da população de <i>Escherichia coli</i> em leite humano cru.....	53
Figura 4 – Distribuição da população de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em leite cru	55
Figura 5 – Distribuição da população de microrganismos mesófilos aeróbios totais (Log UFC/mL).....	566
Figura 6 – Tendência Linear entre as variáveis Acidez Dornic e população de mesófilos para o total de amostras analisadas.....	59
Figura 7 – Tendência Linear entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos para amostras com acidez < 8°D	60
Figura 8 – Tendência Linear entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos para amostras com acidez > 8°D	61
Figura 9 – Distribuição da população de bactérias lácticas em amostras de leite cru (Log UFC/mL).....	63
Figura 10 – Distribuição da população de microrganismos lipolíticos nas amostras de LH cru	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagens bacterianas e acidez (°D) no leite humano cru.....	45
Tabela 2 – Amostras aprovadas para acidez (< 8 °D) e contagens microbianas	48
Tabela 3 – Amostras rejeitadas para acidez (>8 °D) e contagens microbianas	50
Tabela 4 – Correlação de dados referentes a todas as amostras analisadas	58
Tabela 5 – Correlação de dados referentes as amostras aprovadas (<8°D) na análise de acidez Dornic.....	59
Tabela 8 – Correlação de dados referentes as amostras rejeitadas (>8°D) na análise de acidez Dornic.....	61
Tabela 7 - Distribuição da freqüência de consumo alimentar de lactantes doadoras de LH.....	66
Tabela 8 -- Dados agrupados em maior e menor freqüência de consumo.....	67
Tabela 9 – Correlação entre dados de acidez Dornic e nutrição.....	70

1 INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é um alimento único e totalmente adequado à espécie humana. Os seus componentes bioquímicos e celulares, assim como a sua composição de nutrientes são ideais para o desenvolvimento do recém-nascido (HEINE, 1992).

A preocupação com a oferta de leite humano nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e o fato de, por inúmeros motivos, haver impedimentos do recém-nascido receber o leite de sua própria mãe, remetem à questão sobre o funcionamento adequado e a inserção do Banco de Leite Humano (BLH) nas maternidades (CANOTILHO, 2003).

O BLH é responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e execução de coleta, processamento e controle de qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição médica ou de nutricionista (CANOTILHO, 2003).

É responsabilidade do Banco de Leite Humano orientar e executar as operações de seleção e classificação, processamento, controle clínico, de qualidade e de distribuição do leite humano (BRASIL, 1998a).

Os Bancos de Leite prestam serviços principalmente a recém-nascidos prematuros ou de baixo peso, imunologicamente deficientes, com perturbação gástrica de origem variada, alérgicos a outros tipos de leite; e também a doadoras de leite, gestantes, puérperas e nutrízes (BRASIL, 1998b; BRASIL, 1998c).

Nos últimos 15 anos, tendo em vista o rápido crescimento dos Bancos de Leite Humanos no país, diversas publicações no Ministério da Saúde têm sido veiculadas, com objetivo de normalizar o funcionamento destes serviços e promover a garantia da qualidade dos seus produtos, sob o aspecto de risco à saúde (BRASIL, 1998b; BRASIL, 1998c). O regulamento técnico vigente que define as normas para o funcionamento dos BLHs é a RDC 171, de 4 de setembro de 2006.

Ainda assim, muitos desafios são enfrentados pelos Bancos de Leite em suas atividades rotineiramente desenvolvidas. Não bastasse a escassez de recursos nas unidades públicas, que restringe as atividades de assistência, coleta de leite e operacionalização dos Bancos de Leite, há ainda exigências das secretarias de

vigilância sanitária, por questões relacionadas à ação fiscal e à preocupação quanto à segurança do produto (BRASIL, 1998a).

Como forma de proporcionar serviço e atendimento eficientes às doadoras, cada BLH, de forma individualizada e de acordo com os recursos disponíveis, tem tentado desenvolver ações na comunidade onde está inserido. Entretanto, nem sempre a estratégia e articulação montadas são mantidas, resultando em uma relação oscilante (ora mais forte, ora mais fraca) com estes usuários, gerando sazonalidade em termos de atendimento (BRASIL, 1998a).

A seleção das doadoras pode iniciar-se no pré-natal. Todas as gestantes, comprovadamente sadias, por meio de curso ou por orientação das enfermeiras do serviço obstétrico, são motivadas a doar voluntariamente seu leite, explicando-lhes que o hospital não vai recompensá-las. Caso aceitem, passam a integrar o grupo de doadoras, a não ser que sejam consideradas inaptas por algum motivo. Os principais motivos de exclusão de uma doadora são: moléstias infecto-contagiosas, uso de drogas ou medicamentos excretáveis através do leite, em níveis que possam provocar efeitos colaterais; tratamento quimioterápico ou radioterápico; desnutrição (BRASIL, 1998a).

Sabe-se, portanto, que uma das grandes dificuldades do funcionamento dos BLHs é manter um estoque de leite suficiente para atender à demanda, visto que são poucas as mulheres que podem ou se dispõem a doar seu excedente lácteo e que a produção é pequena. Os volumes por doadora alcançam em média 1 L semanal. Assim, toda a amostra recebida deve ser analisada para garantir a saúde do recém-nascido, mas criteriosamente, a fim de não desperdiçar amostras que são muito necessárias ao BLH.

O crescimento bacteriano produz fermentação e acidificação do leite, podendo levar à redução dos componentes nutricionais e imunológicos e desqualificar sua utilização. O LH ordenhado acidificado pode não suprir as necessidades nutricionais específicas dos recém-nascidos prematuros, de baixo peso, ou imunologicamente vulneráveis. A acidificação desestabiliza proteínas solúveis e micelas de caseína, favorece a coagulação, aumenta a osmolaridade, altera o *flavor* (sabor e odor) e reduz o valor imunológico.

Uma das razões da análise de acidez é supostamente a correlação entre a acidez elevada e a atividade bacteriana. Contudo, existem pesquisas que demonstram que amostras de leite humano com contagens microbianas elevadas possuem acidez normal, enquanto outras que apresentam acidez maior que 8° D não possuem contaminação bacteriana elevada. Desse modo, a acidez elevada pode ser fisiológica do leite produzido e não ser indicativo de atividade microbiana e amostras com boas condições sanitárias podem estar sendo descartadas indevidamente.

Em espécies animais como a vaca, há diferenças fisiológicas na acidez do leite, mas o valor estabelecido de 18° D em regra não contempla as variações individuais, visto que a análise é feita em leite de mistura. No caso dos BLHs, a medida da acidez é feita individualmente. Fatores como composição química do leite influem na sua acidez assim como a alimentação da nutriz. Desse modo, a aplicação de questionários sobre os hábitos alimentares das doadoras pode auxiliar a elucidar essa influência.

Este trabalho teve como objetivo estudar a acidez no leite humano e sua correlação entre população microbiana elevada ou se esta é fisiológica, relacionada com a dieta alimentar da lactante.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Composição química do leite humano

A composição do leite humano varia consideravelmente entre mulheres, grupos étnicos e amostras obtidas do leite da mesma mulher, no decorrer da lactação ou até numa mesma mamada (EUCLYDES, 2000). É classificado em colostro, leite de transição e leite maduro.

O colostro é o primeiro produto da secreção láctica da mãe e, em média, permanece até o 4º e o 7º dia pós-parto. Apresenta-se espesso e amarelado. Essa coloração está associada ao seu elevado teor de carotenóides, incluindo α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina. Contém mais proteínas e minerais – principalmente sódio, potássio, cloro e zinco (e menos gordura e carboidratos) – que o leite maduro (EUCLYDES, 2000).

O colostro é rico em anticorpos, protegendo os recém-nascidos contra infecções. Além dessa vantagem, tem a propriedade de facilitar o estabelecimento de uma microbiota intestinal, predominantemente composta por *Bifidobacterium* e com efeito laxativo ajudando na eliminação do mecônio. Durante esse período, a composição do leite sofre alterações rápidas principalmente no que diz respeito à redução no teor protéico e de minerais e aumento na gordura e lactose. Do 7º ao 21º dia, a composição do leite torna-se relativamente mais estável, passando a ser caracterizado como leite maduro (EUCLYDES, 2000).

A composição do leite humano fornece energia e nutrientes necessários e nas quantidades apropriadas ao recém-nascido. Ela varia enormemente entre espécies de mamíferos. O leite adequado para a alimentação dos mamíferos é o homólogo, ou seja, produzido pela espécie em atenção às necessidades imunológicas, fisiológicas e nutricionais do recém-nascido e do lactente. O ideal é que o leite oferecido a qualquer mamífero recém-nascido seja o leite de sua própria espécie (REGO, 2002).

O LH contém fatores que conferem proteção contra infecções virais e bacterianas. As reações alérgicas raramente ocorrem com o seu uso (REGO, 2002).

2.1.1 Proteína

O conteúdo protéico do leite humano é de apenas 8-10g/L, o equivalente a menos de 1/3 da proteína encontrada no leite de vaca. Os maiores teores registrados no passado (12-13g/L) se explicam pela inclusão do N não-protéico, que representa cerca de 20-25% do nitrogênio total, característica que torna este leite diferente do de outras espécies. Dentre os componentes identificados nesta fração o principal é a uréia, sendo também encontrada amônia, creatinina, creatina, ácido úrico, nucleotídeos, glicosaminas, etc. (HAMBRAEUS, 1990).

As proteínas do leite humano constituem mistura heterogênea e podem se dividir em dois grandes grupos: caseína e proteínas do soro: lactoalbuminas. A maior parte das proteínas do leite humano constitui-se na fração do soro, enquanto no leite de vaca predomina a caseína (LONNERDAL, 1985).

A alta relação proteínas do soro/caseína em leite humano resulta na formação de coalho mais suave no estômago, redução do tempo de esvaziamento gástrico e facilidade de digestão (AKRÉ, 1990).

Considerando-se que parte das proteínas do soro de leite tem função imunológica e que muitas delas são resistentes à digestão no trato gastrointestinal, particularmente a IgA e a lactoferrina, o teor protéico nutricionalmente disponível na verdade acaba sendo reduzido a apenas 0,006 a 0,008 mg/mL. Esse baixo teor protéico do leite humano é necessário, considerando a imaturidade do organismo do recém-nascido e é compensado pela excelente qualidade da proteína (BENKOV; LeLEIKO, 1987).

A concentração de proteína do soro do leite humano decresce no decorrer da lactação; na fase de colostro a relação caseína:proteínas do soro é de 10:90, enquanto no leite maduro essa relação se aproxima de 30:70. No leite de vaca esta relação é estimada em 82% de caseína e 18% de proteínas do soro (BENKOV; LeLEIKO, 1987).

Diferente da caseína bovina, a caseína do leite humano possui função construtora e baixa capacidade tamponante. Contém a maior parte de cálcio e fósforo coloidais. O cálcio está aprisionado dentro das micelas de caseína, sendo disponibilizado à medida que ocorre digestão das micelas (LONNERDAL, 1985).

As micelas de caseína encontram-se em estado de suspensão coloidal, com equilíbrio precário no leite. As outras frações encontram-se em estado de solução e são constituída de hormônios, proteínas do soro, enzimas, hidratos de carbono, fatores de crescimento, água, vitaminas hidrossolúveis e sais minerais (HECK, 2002).

2.1.2 Lipídios

O conteúdo de gordura do leite materno é idealmente adequado às necessidades fisiológicas do recém-nascido humano. Após 15 dias do parto, as concentrações iniciais de gordura passam de aproximadamente 2g/100mL, para 4g a 4,5g/100mL. Permanecem relativamente estáveis, variando consideravelmente entre indivíduos, no conteúdo total de lipídios e na composição dos ácidos graxos (AKRÉ, 1990).

A gordura do leite humano é secretada em glóbulos microscópicos, menores que os glóbulos de gordura do leite de vaca. Os triglicerídeos predominam, perfazendo 98%

dos lipídios dos glóbulos. As membranas globulares são compostas por fosfolipídios, esteróis (especialmente colesterol) e proteínas. A composição de ácidos graxos é relativamente estável: cerca de 42% de ácidos graxos saturados e 57% de ácidos graxos insaturados. Apesar da concentração de ácido linoléico e outras gorduras poliinsaturadas ser influenciada pela dieta e pela composição dos lipídios corpóreos da mãe, o LH é rico em ácidos graxos insaturados de cadeia longa, importantes para o desenvolvimento e mielinização do cérebro (AKRÉ, 1990).

Os ácidos araquidônico e linoléico são particularmente importantes entre as gorduras poliinsaturadas. O primeiro é essencial na infância, porque o ácido linoléico não é tão prontamente conversível *in vivo* em ácido araquidônico. O conteúdo de ambos é 4 vezes maior no leite humano que no leite de vaca (0,4g e 0,1g/100 mL, respectivamente). O leite humano pode conter quantidades significativas de prostaglandinas e compostos antivirais associados a lipídios, enquanto seus suscedâneos não os contêm (AKRÉ, 1990). O leite materno proporciona de 35% a 50% da ingestão energética diária em forma de gorduras.

A parte lipídica encontra-se em estado de emulsão que constitui-se, além da gordura emulsificada, lipases e outras enzimas na membrana do glóbulo.

Há variações na concentração do leite ao longo da mamada. Considerando-se uma mamada com início, meio e fim, verificamos que no início é fornecido ao lactente a fração solução com menor conteúdo energético e somente no final da mamada a fração emulsão, com maior teor de gordura, é secretada (HECK, 2002).

2.1.3 Carboidratos

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, embora o leite contenha pequenas quantidades de galactose, frutose e outros oligossacarídeos livres. É um açúcar encontrado apenas no leite e constitui-se de um dissacarídeo, formado por glicose e galactose. No leite humano é o açúcar que representa maior concentração (em média 4% no colostro e até 7% no leite maduro). A lactose parece ser um nutriente

específico da infância, pois a enzima lactase é encontrada apenas em filhotes de mamíferos (AKRÉ, 1990).

A lactose fornece, aproximadamente, 40% das necessidades energéticas e exerce outras funções. No intestino é hidrolisada em glicose e galactose pela enzima lactase, sendo a galactose, constituinte dos galactolipídios necessária ao desenvolvimento do sistema nervoso central. A lactose facilita a absorção de cálcio e de ferro no intestino e promove a colonização intestinal com *Bifidobacterium*, bactérias fermentativas que geram meio ácido no trato gastrintestinal, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, fungos e parasitas (AKRÉ, 1990).

2.1.4 Vitaminas

As principais vitaminas presentes no leite humano são A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, K, niacina e ácido fólico. A concentração de vitaminas no LH é quase sempre adequada às necessidades dos bebês, mas varia com a ingestão materna. A ingestão de vitaminas lipossolúveis oscila marcadamente, dada a variabilidade da concentração de gorduras no leite humano e sua relação com a dieta materna. A concentração de vitamina A é maior no leite humano do que no de vaca, exceto em populações desnutridas. Sua quantidade no colostro é o dobro da encontrada no leite maduro. A deficiência de vitamina A no segundo ano de vida é mais comum entre infantes desmamados precocemente do que entre os que ainda mamam (AKRÉ, 1990).

No puerpério imediato, a concentração de vitamina K é maior no colostro e no leite inicial do que no final. Após duas semanas, a microbiota intestinal que fornece vitamina K se instala no intestino dos bebês amamentados com leite materno. A concentração de vitamina D no leite humano é baixa (média de 0,15mg/100mL) e por muitos anos foi vista como insuficiente para as necessidades do bebê. Entretanto, bebês exclusivamente amamentados não desenvolvem esta deficiência. Variações em teores de vitaminas hidrossolúveis dependem da dieta da mãe, mas as concentrações no leite das bem nutridas são mais que suficientes (AKRÉ, 1990).

2.1.5 Minerais

A concentração da maioria dos minerais no leite materno (cálcio, ferro, fósforo, magnésio, zinco) não é significativamente afetada pela dieta materna. A concentração de minerais é menor no leite materno que nos substitutos e mais bem adaptada às necessidades nutricionais e a capacidades metabólicas de bebês (AKRÉ, 1990).

O cálcio é absorvido mais eficientemente devido à alta relação cálcio:fósforo do leite humano (2:1). A maior proporção de fósforo no leite de vaca determina sua absorção preferencial e provoca hipocalcemia neonatal, mais comum entre bebês alimentados artificialmente. A disponibilidade de cálcio em leite de vaca é menor pela formação de ácidos graxos insolúveis no intestino, que podem causar obstrução e perfuração intestinal. A proporção cálcio:fósforo dos substitutos de leite materno vem sendo modificada para melhorar a absorção de cálcio, apesar de ser muito grande a variabilidade (AKRÉ, 1990).

A alta biodisponibilidade do ferro do leite humano resulta em interações complexas entre os componentes do leite materno e o organismo do bebê. Quase 70% do ferro presente no leite materno é absorvido, contra 30% do leite de vaca e 10% dos substitutos do leite materno. Para compensar a baixa biodisponibilidade, grandes quantidades de ferro devem ser adicionadas às fórmulas, o que favorece o desenvolvimento de bactérias intestinais e patogênicas (AKRÉ, 1990).

O zinco é essencial na estrutura de enzimas, crescimento e imunidade celulares. As quantidades no LH são pequenas, porém suficientes para as necessidades do bebê, sem perturbar a absorção de cobre e ferro. Sua biodisponibilidade é alta, se comparada aos substitutos do LH (AKRÉ, 1990).

2.2 Controle de Qualidade do Leite Humano

2.2.1 Funcionamento do Banco de Leite Humano

O controle de qualidade do LH, em BLHs, baseia-se na adoção de medidas preventivas e de controle, recomendadas pelo Ministério da Saúde (RDC 171 de 04/09/2006), que se aplicam tanto na cadeia de produção quanto na higiene de instalações e pessoal. O controle de qualidade visa principalmente o controle sanitário do processo final (BRASIL, 1998b; BRASIL, 1998c).

O fluxograma apresentado na Figura 1 demonstra as atividades rotineiramente desenvolvidas em Bancos de Leite Humano.

Figura 1- Fluxograma do Processamento do leite em um BLH

Ordenha – A ordenha é feita pelas próprias doadoras em suas residências. As doadoras são orientadas por funcionários do BLH quanto às condições higiênico-sanitárias e procedimento da coleta.

Coleta domiciliar - O acondicionamento do leite no domicílio é feito em frascos estéreis anteriormente distribuídos pelo BLH; para identificação dos frascos usa-se: data da primeira e última ordenha, nº da doadora e volume total obtido. O leite deve ser mantido congelado em *freezer* ou congelador doméstico e chegar ao BLH nas mesmas condições.

Coleta – BLH – A ordenha é realizada pela própria nutriz com o auxílio ou não da enfermeira. O leite é acondicionado em frasco estéril identificado e posteriormente congelado.

Descongelamento – As amostras coletadas que se encontram congeladas, são levadas ao banho-maria a 40°C, onde serão descongeladas.

Reenvase – Nesta etapa, o leite é reenvasado em frascos de vidro, de volume conhecido e identificado devidamente com: nº da doadora, data e volume recebido para pasteurização.

Pasteurização – Na fase de aquecimento, os galheteiros contendo os frascos reenvasados são levados ao pasteurizador. O tratamento térmico deve ser de 30 minutos à 62,5°C de temperatura. Deve-se realizar o controle da temperatura do equipamento e das amostras – uso de frasco controle com termômetro inserido.

Em seguida, acontece a etapa de resfriamento, na qual, transcorrido o tempo de tratamento térmico, as amostras devem ser transferidas imediatamente ao resfriador, que possui uma temperatura de 5°C. As amostras devem permanecer por exatos 5 minutos.

Acondicionamento – As amostras são armazenadas congeladas em *freezer* (-18°C) próprio para amostras que aguardam liberação.

2.2.2 Controle de Qualidade Laboratorial

Procurando atualizar e concentrar informações que forneçam bases científicas e tecnológicas que viabilizem assegurar a qualidade de leite humano ordenhado são realizadas, rotineiramente, as análises laboratoriais.

As análises físico-químicas são realizadas logo após o descongelamento das amostras. Então, uma alíquota de leite é separada e apenas 1 mL do leite cru é utilizado para determinação da acidez Dornic. As amostras são tituladas e aquelas que apresentam acidez inferior a 8 graus Dornic (°D) são reenvasadas para posterior pasteurização. Aquelas que apresentam acidez titulável acima de 8°D são desprezadas (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. FIOCRUZ, 2006).

Neste mesmo instante, as alíquotas das amostras aprovadas quanto à acidez são analisadas quanto ao teor calórico, numa técnica descrita por Lucas, denominada crematócrito, a qual recebe valor expresso em Kcal/L (LUCAS et al., 1978).

As amostras reenvasadas são pasteurizadas. Depois de todo o tratamento térmico, uma nova alíquota é retirada, em condições de segurança, para realização da análise microbiológica a qual pretende avaliar a eficiência do processo de pasteurização realizado.

Esta análise é indicativa da presença de coliformes totais nas amostras de leite já pasteurizado. As amostras são inoculadas em caldo verde brilhante (VB) contendo tudo de Durhan invertido em seu interior, caso haja formação de gás no interior do tubo de Durhan, esta amostra está rejeitada pois indica presença de coliformes. As amostras negativas, ou seja, com ausência de gás no interior do tubo de Durhan, são liberadas.

Desta maneira, o Banco de Leite seleciona as amostras do *freezer* de acondicionamento do produto pasteurizado, separando as amostras que serão fracionadas das que serão descartadas.

Tais análises fazem parte de um controle de qualidade que pretende, identificar, avaliar e melhorar o desempenho dos serviços prestados pelos BLHs.

Sabendo-se que implantar a qualidade implica mudanças, o processo deve ser constituído com base em profundo envolvimento dos profissionais e dirigentes, a partir

do seu papel na equipe de saúde e motivado por uma liderança efetiva (REBELO, 1996).

Visando reduzir riscos e minimizar custos de inspeção final, a adoção de um sistema de qualidade dinâmico baseado nas Boas Práticas de Fabricação, o sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), seria o ideal.

O APPCC é um sistema complexo, flexível e validado que proporciona confiança quanto à adequada gestão de qualidade do produto, excluindo o tradicional modelo de controle de qualidade com base na inspeção final (MORTIMORE; WALLACE, 1995).

2.3 Análises Laboratoriais

2.3.1 Controle Microbiológico

No leite obtido de mães sadias, bactérias comensais dos grupos *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Propionibacteria* e *Bifidobacteria* são freqüentemente encontradas proveniente de mamilo, auréola e tecidos adjacentes, bem como de dutos lactíferos que foram colonizados (MACKIE et al., 1999).

Há muita controvérsia em relação aos microrganismos mais indicativos ou representativos da qualidade sanitária do LH. Os contaminantes de origem fecal têm ocupado lugar de destaque nas metodologias que se fundamentam em indicadores de qualidade. Historicamente a relação de causa e efeito no processo de transmissão de doenças relacionando às fezes foi postulada por Von Fristsch em 1880, após identificar *Klebsiella sp* em fezes humanas. Posteriormente, Escherich descreveu o *Bacillus coli* (*Escherichia coli*), sugerindo a sua utilização como um indicador de poluição fecal. Com o avanço do conhecimento científico, descobriu-se a ocorrência de diferentes patógenos nas fezes, de forma descontínua e em populações variáveis. Assim, inúmeros estudos foram desenvolvidos no sentido de definir um indicador para a presença destes microrganismos nas fezes do homem e dos animais de sangue quente.

No leite humano comumente são encontradas bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *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 de vaca. 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 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 origem fecal, direta ou indireta, têm sido os coliformes totais e fecais e *E. coli*. Jay (1992), sugeriu que o grupo coliforme poderia ser utilizado como índice de contaminação fecal, uma vez que pode ser mais facilmente detectado que espécies de *Salmonella*. Assim, leite que contenha bactérias do grupo coliformes é inaceitável para o Banco de Leite Humano. Os coliformes são comumente utilizados como indicadores higiênico-sanitários no Brasil (BRASIL, 2001) e exterior (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). 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 Humanos. Por habitar comumente a pele e fossas nasais, o *S. aureus* também pode muitas vezes ser considerado indicador das condições de manipulação (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Pontes, Iwasaki e Oliveira (2003) avaliaram as condições higiênico-sanitárias do leite humano pasteurizado, distribuído pelo Banco de Leite Humano de um hospital público do Distrito Federal. Para tal, foi pesquisada a presença de coliformes totais e termotolerantes, estafilococos coagulase negativa e positiva e *E. coli*. Os resultados mostraram 33,3% das amostras contaminadas por coliformes totais, nas quais 25,9% delas revelaram contaminação fecal. A presença de estafilococos foi detectada em

44,4% das amostras sendo 3,7% delas do tipo coagulase positiva. E a presença de microrganismos mesófilos foi detectada em 48,1% do total das amostras analisadas. Os resultados obtidos neste estudo são indicativos de falhas na observância dos procedimentos, na manutenção das condições higiênico-sanitárias em toda a linha de processamento para a obtenção do leite humano pasteurizado.

Já Assis Neto et al., (2001a), na análise microbiológica de leite cru, verificaram uma contagem média de $5,7 \times 10^5$ UFC/mL para microrganismos mesófilos aeróbios e $6,0 \times 10^2$ UFC/mL na contagem de microrganismos psicrotróficos. Trinta e dois por cento das amostras tiveram valores entre 3×10^4 e 10^5 UFC/mL para contagem de *S. aureus*. Na enumeração de coliformes totais e fecais, os valores obtidos foram $< 0,3$ a 240 NMP/mL. O leite pasteurizado apresentou média de 1×10^2 UFC/mL para contagem de aeróbios mesófilos. Nenhuma das amostras apresentou coliformes totais, fecais e *S. aureus*. Concluíram que a pasteurização é de vital importância para a manutenção da qualidade higiênico-sanitária em Bancos de Leite Humano.

Silva e Almeida (2001a) determinaram a curva de crescimento de microrganismos mesófilos em leite humano recém-ordenhado, com contagens de UFC/mL nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 16 horas após a ordenha. A avaliação dos resultados obtidos entre taxa de crescimento microbiano e acidez permitiu verificar uma variação estatisticamente significativa após 16 horas do início da coleta nas amostras de leite maduro e permanecendo praticamente estáveis no colostro. Para as amostras de leite maduro, as taxas de crescimento foram positivas desde a primeira hora, sendo que a partir da oitava hora o crescimento bacteriano ultrapassara o limite estabelecido para contagens, acima de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Quanto aos valores de acidez Dornic, obtidos por Silva e Almeida (2001b), variaram entre 1 e 3 °D nas amostras de primeiras horas, comprovando a influência do rigor na assepsia sobre o resultado da análise. As taxas de crescimento bacteriano diferiram entre amostras de leite maduro e colostro, esta explicação pode ser em decorrência dos fatores de proteção existente em maiores quantidades no colostro segundo os autores.

Silva e Almeida (2001b) em novos estudos determinaram a população bacteriana de mesófilos, em UFC/mL, a partir de cultura de leite humano ordenhado cru. Utilizaram 170 amostras de leite humano cru e as técnicas descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001). Este estudo encontrou amostras com contagens menores de 10^1 UFC até 10^7 e concluíram que a contagem microbiana no leite cru é bastante elevada, acreditando na existência de contaminantes externos provenientes de etapas pelas quais o leite passa até chegar ao processamento no BLH. Tais informações ratificaram a necessidade da pasteurização do produto de forma correta, uma vez que, enquanto cru, sua qualidade para o consumo pode estar comprometida.

Lin et al., (1988) e Silva e Almeida (2001b), analisaram o perfil bacteriológico de amostras de leite materno coletadas individualmente e coletadas em Banco de Leite que formam um *pool* com leite de doadoras distintas. Em comparação com as duas situações analisadas observaram que em amostras de leite de doadoras individuais não foi detectada presença de coliformes totais, enquanto a contagem de microrganismos aeróbios totais média foi de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. Para o *pool* de leite materno, verificou-se uma média de $6,8 \times 10^4$ UFC/mL para coliformes e $2,9 \times 10^5$ UFC/mL para microrganismos aeróbios totais. Microrganismos foram isolados e identificados no *pool* de amostras e verificou-se que 42% do gênero *Staphylococcus spp* coagulase negativa e 3% de *S. faecalis* foram encontrados, esta última, é uma importante espécie potencialmente patogênica. Cinquenta e cinco por cento dos microrganismos isolados eram Gram negativos, entre esses 78% eram da família *Enterobacteriaceae*.

Esses estudos concluíram que o risco de contaminação pode ser reduzido se a coleta do leite materno for individual, desde que estas doadoras sejam treinadas quanto aos aspectos sanitários de coleta e estocagem. Diversos tipos e populações de bactérias foram encontradas em amostras do *pool* de leite materno no estudo de Lin et al., (1988), indicando que o tratamento térmico é absolutamente recomendado, em ambas situações, para a garantia de segurança ao consumidor.

Estudos realizados por Scarso (2003), no Instituto Adolfo Lutz, com amostras de leite materno pasteurizado do Banco de Leite de Sorocaba, apresentaram índice de rejeição de 2,6% (102 amostras) do total de amostras de leite materno analisadas (3883

amostras) na análise microbiológica, realizada no período de abril a outubro de 2003. Nas amostras rejeitadas os microrganismos identificados foram: *enterobacter*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*.

Ainda de acordo com Scarso (2003), os resultados constatarem a eficiência do processo de pasteurização, porém nos meses de maio e junho de 2003 os índices de rejeição foram 7,5% e 4,0%, respectivamente. Neste bimestre, os funcionários do BLH estavam em fase de capacitação profissional para realização das análises físico-químicas, portanto, o processo de pasteurização passava por adaptações técnicas e rodízio de funcionários, justificando assim os elevados índices de rejeição encontrados nas análises microbiológicas. Nos meses seguintes, o índice de rejeição de amostras por parâmetros microbiológicos encontrou-se próximo a 1%.

Linderman (2004) verificou a característica do leite humano da mulher doadora de leite para os Bancos de Leite Humano. O estudo contou com 69 mulheres com idade média de 30,7 anos, primíparas. Para cada amostra doada foi verificada a presença bacteriana. Os resultados quanto à ocorrência e tipos de bactérias, foram: 13,1% positivas para *Staphylococcus aureus*, 85% para *Staphylococcus epidermidis*, 2,5% *Serratia sp*, 1,8% *Enterobacter sp* e em 0,45% das amostras foi detectada presença de *E.coli*. Todas as amostras com contagem bacteriana acima de 10^4 UFC/mL foram pasteurizadas a 56° C por 30 minutos. E todas as amostras pasteurizadas foram retestadas quanto à presença microbiana e só aceitas aquelas com sua ausência.

Rodrigues (2005) analisou 60 amostras de LH provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As análises realizadas foram de acidez e microbiologia (*Staphylococcus* coagulase positiva, microrganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes totais e *E.coli*) e análise físico-química quanto à acidez Dornic.

Aparentemente não houve evidências entre acidez elevada e contagem microbiana. O estudo de Rodrigues (2005) encontrou amostras de LH com acidez 3,0°D com contagem microbiana de: $9,2 \times 10$ UFC/mL para estafilococos coagulase positiva; $2,7 \times 10^2$ UFC/mL para microrganismos mesófilos aeróbios; 110 UFC/mL para coliformes totais e $< 0,3$ NMP/mL para *Escherichia coli*. E dados de acidez de 10°D

tendo: $< 1,5 \times 10$ UFC/mL para *Staphylococcus* coagulase positiva; $< 1,0$ UFC/mL para mesófilos aeróbios e $< 0,3$ UFC/mL para coliformes totais e *E.coli*.

Desse modo, algumas amostras rejeitadas por acidez elevada possuíam contagem microbiana baixa e, amostras com índice de acidez aceitável ($< 8^{\circ}\text{D}$) apresentaram elevada contagem microbiológica.

Castro (2006) estudou a qualidade microbiológica do leite cru recebido de um BLH quantificando os microrganismos aeróbios mesófilos totais, *Staphylococcus* coagulase positivos, coliformes totais e *Escherichia coli*. Das 60 amostras analisadas *E. coli* estava presente em 93,99% delas. A população de coliformes totais ficou entre 1 e 99 NMP/mL em 57,77% das amostras encontradas, porém valores na ordem de 10^5 e 10^6 NMP/mL também foram verificados neste estudo (6,66% das amostras analisadas).

Os microrganismos aeróbios mesófilos totais apresentaram-se na quase totalidade das amostras sendo que 34,48% das amostras analisadas tiveram populações microbianas entre 1 e $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 36,2% delas a população microbiana encontrou-se na faixa de 10^2 e $9,9 \times 10^4$ UFC/ mL e as demais, 32,63% das amostras analisadas tiveram valores populacionais obtidos até a ordem de 10^7 UFC/mL.

Do total de amostras analisadas para o grupo dos estafilococos coagulase positiva a maior frequência da população, 78,57% das amostras, foi entre 1 e 99 UFC/mL porém 7,14% das amostras tiveram valores apresentados na ordem de 10^4 UFC/mL.

Novak e Cordeiro (2007) determinaram a relação entre população total de microrganismos aeróbios mesófilos e os valores de acidez Dornic no leite humano ordenado. Os resultados encontrados nesta pesquisa apontaram associação direta entre a população de microrganismos mesófilos e os valores de acidez Dornic. Foram analisadas 200 amostras das quais 192 (96%) estavam dentro dos valores de acidez aprovados para o consumo ($\leq 8^{\circ}\text{D}$). Cada intervalo crescente de acidez Dornic correspondeu a um valor maior e diferente de população microbiana. Os intervalos estabelecidos por esta pesquisa em UFC/mL foram: **1.** $1,0 \times 10^2 - 6,3 \times 10^2$; **2.** $6,6 \times 10^2 - 5,7 \times 10^3$; **3.** $6,4 \times 10^3 - 3,6 \times 10^4$; **4.** $4,0 \times 10^4 - 9,0 \times 10^4$; **5.** $1,3 \times 10^5 - 4,6 \times 10^5$; **6.** $4,9 \times 10^5 - 6,2 \times 10^5$; **7.** $6,6 \times 10^5 - 6,7 \times 10^5$; **8.** $8,0 \times 10^5 - 9,3 \times 10^5$; **9.** $5,5 \times 10^6 - 7,6 \times 10^6$; **10.** $1,2 \times 10^7 - 1,3 \times 10^7$; **11.** $1,5 \times 10^7$. Como a população de microrganismos aeróbios mesófilos inclui a

maioria dos contaminantes presentes no leite humano ordenhado, dentre eles os patogênicos, e permite uma visão geral da carga microbiana existente, sua estreita correlação com os valores de acidez Dornic indica que a determinação de acidez Dornic é um método eficaz para avaliar indiretamente o crescimento bacteriano do LHO.

Como não existe na literatura especializada dados sobre pesquisa de bactérias lácticas em leite humano ordenhado, ficou estabelecido o uso do meio MRS - utilizado para pesquisa deste microrganismo em outros tipos de alimentos - para a realização do presente estudo. Tal meio foi idealizado para estimular o crescimento de bactérias lácticas que incluem as espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Todas essas espécies podem produzir ácidos lácticos em grande quantidade. São Gram-positivos, catalase e oxidase negativos e fastidiosas em suas exigências nutricionais. O crescimento é considerado maior em condições de microaerofilia.

Geralmente, as bactérias lácticas apresentam crescimento lento e tamanho de colônias menor que os demais microrganismos. Em meios não seletivos, seu crescimento pode ser superado pelos demais microrganismos, especialmente quando necessária a incubação de 2-4 dias.

A seleção pode ser obtida através de ajuste de pH, pois os lactobacilos toleram pH mais baixo que os estreptococos (pH 5 – 6,5), sendo que os pediococos e leuconostocos crescem melhor nessa faixa de pH. Os inibidores dos principais grupos de competidores são: acetato de tálio, acetato de sódio, ácido sórbico, ácido acético, nitrito de sódio, cicloheximida e polimixina. Tais substâncias podem ser utilizadas em concentrações e combinações variáveis, mas é inevitável que haja um equilíbrio entre seletividade e produtividade em relação ao microrganismo procurado.

Os lactobacilos são microaerófilos e, geralmente requerem placas em camada para cultivo aeróbio em meios sólidos. Colônias submersas ou superficiais podem ser compactas ou não, são pequenas, opacas e brancas.

A literatura não aborda também pesquisas de microrganismos lipolíticos em leite humano, mas sabe-se que este tipo de microrganismo é responsável pela quebra da gordura contribuindo assim para o “*off-flavor*” do leite de outras espécies e a produção de ácidos graxos livres (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992).

As bactérias lipolíticas são na sua maior partes aeróbicas ou facultativas, formadoras de lípases e encontradas em muitos gêneros como: *Pseudomonas*, *Archromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* e outros (GALO, 1978).

As lipases bacterianas não são inativadas pelo processo de pasteurização, em geral, essas enzimas são originárias da contaminação microbiana durante ou após o processo. Tais enzimas são termorresistentes e crescem em leite estocado em temperaturas entre 2 e 4 °C (ALLEN; HAMILTON, 1994).

Novak, Almeida e Silva (2003), em suas pesquisas utilizaram a técnica de *pour plate* e ágar Tributirina (Merck) com incubação a 25 °C por até 5 dias, para análise de microrganismos lipolíticos em casca de banana utilizada por muitas mulheres como terapia por fissuras mamilares.

Segundo Haas (2001), para detecção de microrganismos lipolíticos utilizando a tributirina como substrato, são necessários de 4 a 7 dias de incubação a temperatura de 20 a 30 °C e deve-se considerar como positivos o aparecimento de um halo de degradação em torno das colônias formadas.

2.3.2 Controle Físico-químico

Como o controle físico-químico do leite humano ordenhado cru requer métodos rápidos, práticos e com baixo custo operacional, o Centro de Referência Nacional dos Bancos de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz vem promovendo estudos que visam desenvolver metodologias alternativas para o controle de qualidade do leite humano dos BLH do Brasil (BRASIL, 2001).

A acidez do leite humano pode ser classificada como original e desenvolvida. A original resulta da presença de seus constituintes e a desenvolvida decorre do ácido láctico, produzido a partir do crescimento bacteriano. As bactérias, integrantes tanto da microbiota primária quanto da secundária, fermentam a lactose do leite humano, produzindo ácido láctico (FIOCRUZ, 2006).

Cada molécula de lactose metabolizada produz 4 moléculas de ácido láctico, o que, além de aumentar a acidez do produto, concorre também para o aumento da osmolaridade e para a diminuição da biodisponibilidade do cálcio e fósforo presentes.

Essa redução resulta do ataque químico do ácido láctico às micelas de caseína, levando à precipitação e conseqüente insolubilização do cálcio, que, apesar de presente no leite e ser passível de detecção quantitativa através das técnicas laboratoriais usuais, tem a sua biodisponibilidade reduzida. Quanto maior a quantidade de ácido láctico produzido, menor a biodisponibilidade de cálcio e fósforo no leite humano ordenhado (FIOCRUZ, 2006).

O que habitualmente se conhece como acidez do leite, é a acidez total - resultado de uma valoração titulométrica, que se mede pela adição ao leite de volume necessário de solução alcalina de concentração conhecida para alcançar o ponto de viragem de um indicador, geralmente a fenolftaleína, que muda do incolor para o rosa.

Existem diferentes maneiras de mensurar a acidez. A acidez titulável (expressa em Graus Dornic) utilizada para classificar o leite humano, indica o conteúdo de ácido láctico por litro. Refere-se ao número de décimos de mililitros de solução de NaOH N/9 utilizados para titular 1 mL de leite em presença do indicador fenolftaleína, em solução alcoólica a 1% (HECK, 2000).

Os diferentes leites têm uma reação iônica próxima da neutralidade. O pH não é um valor constante e pode variar ao curso do ciclo da lactação e sob a influência da alimentação. O pH do leite humano é próximo da neutralidade, situando-se entre 6,5 e 6,9.

A acidez titulável do leite humano fresco imediatamente após a ordenha encontra-se entre 3 e 6 graus Dornic, em média. O leite é um sistema tamponante com baixa concentração de íon hidrogênio livre e a quantidade total do ácido pré-formado somente pode ser obtida pela medida da acidez titulável e não através do pH (CAVALCANTE, 2005).

A acidez do leite humano para consumo deve ser de 0° a 8° Dornic, visto que valores acima indicam a redução do valor nutricional, desestabilização das proteínas solúveis e micelas de caseína, favorecimento de coagulação, sempre estão associados a ação de microrganismos, alteração do *flavor* ou redução de valor imunológico (HECK, 2000).

O estudo desenvolvido por Cavalcante et al., (2005), buscou avaliar dados sobre a acidez Dornic de leite humano ordenhado cru congelado e sua relação com binômio

tempo/temperatura juntamente com a determinação de creme, gordura total e valor energético. Tal estudo conclui que o aproveitamento de amostras com acidez titulável superior a 7ºD para neonatos é inviável por dois motivos: primeiro pela redução do teor de creme, gordura total e valor energético; segundo pelo risco de causar acidose ou alcalose metabólica e enterocolite necrosante. O uso do teste de acidez titulável constitui uma ferramenta no controle de qualidade do leite humano cru e a possibilidade de neutralizar rapidamente ou evitar a acidez excessiva do leite humano ordenhado sem prejuízo no valor nutricional e imunológico, ainda constitui objetivo de pesquisas futuras.

Estudos realizados por Scarso (2003), procuraram fatores que poderiam estar influenciando nos índices elevados de acidez encontrados pelo Instituto Adolfo Lutz e pelo Banco de Leite do Conjunto Hospitalar de Sorocaba, nas amostras de leite materno doadas. Neste estudo, observa-se um número crítico de amostras rejeitadas quanto à acidez (24,2%) no período de abril a outubro de 2003. Portanto, das 1858 amostras analisadas, 449 apresentaram valores iguais ou maiores que 8ºD.

Os principais pontos críticos analisados para estabelecer as possíveis causas de acidez elevada foram: solução Dornic (Hidróxido de Sódio 0,1N), fator de correção da solução Dornic; vidrarias (resíduos de reagentes), modo de lavagem das vidrarias (Procedimento Operacional Padrão), bom senso do analista na titulação (quanto à tonalidade rósea), volume da gota titulada, repetibilidade da determinação de acidez Dornic e condições higiênico-sanitárias. Os resultados encontrados não apontaram valores estatisticamente significantes quanto aos parâmetros analisados.

2.4 Consumo de Alimentos

A lactação é uma das maneiras mais eficientes de atender os aspectos nutricionais, imunológicos, psicológicos e o desenvolvimento da criança no seu primeiro ano de vida (ICHISATO, 2001).

A lactação provoca no organismo feminino modificações fisiológicas que resultam em aumento dos requisitos nutricionais. A dieta, nestas circunstâncias, deve prover as necessidades básicas do organismo materno e, também, suprir a quota recomendada

para a produção láctea de forma a manter as condições de nutrição da mulher durante a lactação (TUDISCO et al., 1985).

Supostamente, a lactante deverá secretar 850 mL de leite por dia, porém, vários fatores influenciam essa quantidade. Em média, a mulher é capaz de secretar meio litro de leite entre a primeira e segunda semana pós-parto, depois, até um litro pode ser secretado por dia até o quinto mês pós-parto (WILSON; FISHER; FUQUA, 1975).

Estudos de Tudisco et al., (1985) verificaram a ingestão de alimentos por mulheres no período da lactação. Foram entrevistadas 190 lactantes em visitas domiciliares. O questionário foi elaborado na forma de inquérito alimentar que relata o recordatório de 24h. Os alimentos foram agrupados em: cereais e derivados, feculentos, leguminosas, hortaliças, frutas, carnes e ovos, embutidos, leite e derivados. O estudo identificou o padrão alimentar caracterizado por açúcar refinado, óleo vegetal, arroz, feijão, pão, leite C, carne de vaca, batata, macarrão, alface, tomate, banana e laranja, mostrando ser a dieta satisfatória em termos qualitativos e indicando que o grupo analisado é bastante racional na seleção de seus alimentos.

Soares et al., (2000), focaram seus estudos na alimentação de lactentes, caracterizando o padrão alimentar de crianças menores de um ano de idade. O estudo era realizado na cidade de Fortaleza e ao todo 110 crianças participaram da pesquisa. Os dados foram coletados por meio de entrevista domiciliar no qual o entrevistado-alvo foi o responsável direto pelos cuidados da criança. O cálculo das adequações das dietas mistas foi feito através da ingestão de leite materno (número médio de mamadas/dia). O estudo pode concluir que as mães eram inseguras e/ou inadequadamente informadas quanto à prática do aleitamento materno exclusivo. O consumo de leite artificial foi observado em 89% das crianças já desmamadas, sendo que o seu consumo variou entre 2 a 3 vezes por dia em 72% das crianças em aleitamento parcial. A maioria das crianças também recebia chá e água, os quais têm sido associados com o significativo aumento de infecções diarréicas. As crianças estudadas tinham acesso a uma considerável variedade de alimentos podendo ser listado, ao todo, 48 produtos distintos.

3 Material e métodos

3.1 Amostragem

Para realização deste trabalho, foram analisadas amostras de leite cru com valores de acidez conhecidos. As alíquotas restantes no tubo de ensaio foram identificadas quanto à classificação de acidez Dornic recebida (°D) e posteriormente congeladas para execução das análises microbiológicas.

Foram realizadas análises de acidez em 72 amostras de leite humano, sendo 24 amostras com acidez elevada (rejeitadas) e 48 amostras com acidez normal. As amostras ácidas dependeram da demanda de leite materno recebido pelo Banco de Leite no período do estudo e ainda da insuficiência de amostras rejeitadas por acidez no mesmo período.

As amostras foram identificadas com nome ou número da doadora e o valor de acidez Dornic encontrado e foram encaminhadas em tubo de ensaio, congeladas e transportadas em caixa isotérmica, para o Laboratório de Higiene e Laticínios do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba, SP.

3.2 Determinação da acidez

3.2.1 Recepção

Os tubos de ensaio contendo as alíquotas de leite materno cru, separadas logo após o processo de descongelamento no BLH, chegavam ao Setor de Bromatologia e Química do IAL resfriadas, pois, eram transportadas em caixa isotérmica revestida de gelo.

As amostras foram conferidas por funcionário local do laboratório quanto à identificação do número da doadora, número da amostra, quantidades e grau de conservação (temperatura de resfriamento).

Posteriormente, era dado um número seqüencial de registro local e promovida a agitação em vórtex (homogeneização) de cada uma das amostras para execução da análise de acidez Dornic, por titulação.

3.2.2 Análise de acidez

A titulação do leite foi realizada com solução Dornic, usando como indicador a solução alcoólica de fenolftaleína 1%, até a obtenção da cor rosa clara persistente, expressa em graus Dornic (°D) (BRASIL, 1981). Foi realizada em acidímetro Dornic, com capacidade de 2 mL. Cada 0,01mL gasto da solução de NaOH 0,1N corresponde a 1°D. As análises foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba.

3.3 Análise microbiológica

3.3.1 Recepção

As amostras congeladas, identificadas quanto à acidez Dornic foram encaminhadas para o Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” onde foram realizadas as análises de coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, microrganismos mesófilos aeróbicos totais, bactérias lácticas e bactérias lipolíticas.

3.3.2 Preparo da amostra

Foram pesquisados todos os grupos de microrganismos citados em 3.4.1.. As análises foram feitas em duplicata, sendo diluições até 10^{-5} para microrganismos mesófilos aeróbios totais. Para o grupo das bactérias lácticas e lipolíticas foram utilizadas diluições até 10^{-4} e diluições até 10^{-3} para os *Staphylococcus* coagulase

positiva. Para a pesquisa de coliformes totais e *E.coli* foi utilizada a série de 3 tubos do NMP com diluições até 10^{-3} . As análises foram realizadas de acordo com a metodologia da *American Public Health Association*, descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

Para a realização das diluições decimais, 1,0 mL de leite humano foi adicionado em 9 mL de água salina peptonada estéril contida em tubos de ensaio, obtendo assim uma diluição 10^{-1} . Logo em seguida, 1,0 mL desta diluição foi retirado, com auxílio de pipeta graduada estéril, e transferido para outro tubo de ensaio contendo água salina peptonada nas mesmas condições descritas anteriormente; esta foi a diluição 10^{-2} da amostra inicial e foram feitas, sucessivamente, até a diluição necessária estabelecida nas análises preliminares para cada microrganismo.

3.3.3 Pesquisa para coliformes totais e *E. coli*

Após realizadas as diluições decimais, foi feita a contagem de coliformes totais e *E. coli* pela técnica do Número Mais Provável (NMP), descrita por Kornalki e Johnson (2001).

A técnica consiste em inocular 1 mL de cada amostra diluída anteriormente (10^1 , 10^{-2} , 10^{-3}) em caldo Lauril Sulfato Triptose modificado com MUG – 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo (LST-MUG) com tubos de Durham invertidos. Os tubos de ensaio inoculados foram incubados a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica. Os tubos suspeitos, apresentando crescimento com presença de gás no interior do tubo de Durham, foram transferidos com o auxílio de alça microbiológica para tubos de ensaio com caldo Verde Brilhante (VB) com tubos de Durham invertidos e incubados novamente em estufa bacteriológica à temperatura de 35°C por 48 horas.

A confirmação foi dada pelo crescimento com gás no interior do tubo de Durham e o resultado dos tubos positivos aplicados na tabela do NMP.

Os tubos LST-MUG com presença de gás confirmaram a presença *E. coli*. Tal confirmação é dada quando submetemos os tubos positivos à luz ultravioleta. O MUG é um composto não fluorescente, porém na presença da enzima β -glicuronidase,

presente nas cepas de *E. coli*, é degradado formando um composto fluorescente sob luz UV. Os tubos fluorescentes foram considerados positivos para *E. coli* e os dados encontrados aplicados na tabela do NMP.

Os resultados foram expressos em NMP/mL, tanto para *E. coli* quanto para coliformes totais.

3.3.4 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo

Para contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi seguida a metodologia descrita por Lancete e Bennett (2001). Foi inoculado, em duplicada, 1,0 mL da amostra de leite em superfície, distribuído por 4 placas de ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas com solução salina de gema de ovo 50% mais 0,1% de telurito de potássio e secas; sendo 3 com 0,3 mL e uma com 0,1 mL; O espalhamento foi com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica.

Após a incubação foi feita a contagem das colônias típicas: negras, pequenas, com halo translúcido ao seu redor. Em um momento inicial da análise, foi necessário estabelecer grupos de colônias com características semelhantes. Foi realizada a contagem de cada grupo e selecionada uma colônia representativa de cada grupo para as análises confirmatórias. As colônias selecionadas foram submetidas à 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 foi espalhada, sobre lâmina de vidro previamente flambada, a colônia suspeita, com auxílio de alça de platina e pingada uma gota de solução de Peróxido de Hidrogênio 3%. Foram consideradas positivas, as colônias que apresentaram formações de bolhas.

As colônias selecionadas para o teste da coagulase foram incubadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubadas à 35°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, foi adicionado em um tubo de ensaio estéril 0,2 mL da cultura obtida no caldo BHI,

previamente incubado, e 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA, observando-se a formação de coágulo.

Confirmados os testes o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.3.5 Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbicos totais

Seguindo metodologia descrita por Morton (2001), diluições sucessivas que variaram de 10^{-1} a 10^{-5} foram inoculadas, em duplicata, por profundidade utilizando Plate Count Agar (PCA). Em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas à temperatura de 35 °C. Transcorrido o período de incubação foi realizada a contagem das colônias com o auxílio do contador – Phoenix CP 500. O resultado foi expresso em UFC/mL.

3.3.6 Pesquisa de bactérias lácticas

De acordo com Hall, Ledenbach e Flowers (2001), alíquotas de 1,0 mL do leite foram inoculadas em ágar MRS Oxoid, seletivo para bactérias lácticas, pela técnica do *pour plate*, semeadas em duplicata com diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . Após a solidificação do meio nas placas de Petri, acrescenta-se uma camada adicional de ágar MRS à superfície do meio para formar uma sobre-camada.

A incubação foi feita à 35°C por 48 horas com as placas invertidas.

Foi observado o crescimento de colônias esbranquiçadas, opacas e pequenas. As colônias foram contadas com o auxílio do contador de colônias. O resultado foi expresso em UFC/mL.

3.3.7 Pesquisa de bactérias lipolíticas

Alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram inoculadas em placa com ágar tributirina, específico para contagem de bactérias lipolíticas, por plaqueamento por

profundidade e incubadas a 25 °C e incubadas por até 5 dias. As colônias típicas circundadas por um halo de lipólise foram selecionadas e contadas.

O resultado foi expresso em UFC/mL.

3.4 Elaboração e aplicação do questionário de consumo alimentar

Uma vez que os dados de consumo alimentar permitem observar as características e o hábito alimentar de uma população segundo Costa et al., (2007), o presente estudo procurou relatar a alimentação de um grupo de mulheres – lactantes doadoras de leite – através da utilização de um questionário de frequência alimentar.

O Banco de Leite Humano que colaborou com a pesquisa possui um número reduzido de doadoras em seu banco de dados, formado por aproximadamente 30 doadoras regularmente cadastradas. Destas 90% pertencem a classe sócio-econômica baixa, residindo em lugares de difícil acesso e na sua maioria em condições de saneamento básico precárias. Esse número variou consideravelmente pois o BLH em questão possui um acordo de cooperação com unidades de postos de coleta de leite humano que enviam LH para a pasteurização e tais amostras também foram contempladas nesta pesquisa.

A caracterização do padrão de consumo alimentar foi realizada agrupando-se os alimentos mais consumidos pelas lactantes em grandes grupos, ou seja, grupo das hortaliças: alface, couve e chicória; grupo das frutas e grupo das leguminosas.

O questionário foi aplicado pela própria mestranda, durante as coletas domiciliares, em nutrízes que faziam parte do grupo de doadoras do BLH de Sorocaba.

Foi realizada uma entrevista, inquérito alimentar, com as doadoras a respeito de sua alimentação. O registro alimentar incluiu: horário das refeições, forma de preparo dos alimentos e quantidades em medidas caseiras (uso de catálogo fotográfico).

Durante a entrevista foi possível observar uma dificuldade das doadoras na distinção dos itens em questão, como é o caso da margarina citada inúmeras vezes como manteiga. O mesmo aconteceu com o grupo das leguminosas no qual sempre houve necessidade de exemplificação de produtos.

O recordatório alimentar foi aplicado, porém os relatos encontrados não foram utilizados na análise final dos dados visto que os valores obtidos na parte de frequência alimentar apresentaram baixa correlação entre acidez do LH e consumo das lactantes.

Através do questionário foi possível verificar a frequência de consumo de uma certa variedade de alimentos os quais se destacam: alimentos ácidos (frutas, legumes), à base de amido (arroz, batata, entre outros), leguminosas em geral e os alimentos gordurosos ou associados a grandes índices de teor calórico.

Como critério de seleção dos alimentos a serem aplicados no questionário usou-se a hipótese da degradação lipídica de alguns alimentos e a constituição naturalmente ácida de outros. Tais critérios poderiam, supostamente, interferir na acidez do leite materno. Com adequações de acordo com os interesses da pesquisa procurou-se enfatizar grupos que continham alimentos ácidos e ou gordurosos que durante o metabolismo poderiam produzir ácidos livres que interfeririam na acidez do leite secretado. Para o desenvolvimento da pesquisa, o projeto foi submetido ao comitê de ética. E para a aplicação dos questionários foi apresentado e distribuído o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO) a cada doadora participante.

QUESTIONÁRIO SOBRE CONSUMO DE ALIMENTOS
DOADORA Nº _____

Período de Lactação

() até o 7º dia pós-parto () entre o 7º e 15º dia pós-parto () após o 15º dia do parto

Utiliza algum tipo de medicamento? () SIM () NÃO Freqüência: _____

Freqüência de consumo alimentar

ALIMENTOS	D	S	M	E	N
LEITE					
OVOS					
CARNE BOVINA					
FRANGO					
PEIXE					
MIÚDOS					
LEGUMINOSAS					
HORTALIÇAS					
DOCES					
FRITURAS					
REFRIGERANTES					
SUCOS					
CAFÉ					
BEB. ALCÓOLICA					
FRUTAS					
MANTEIGA					
MARGARINA					
BANHA					
ÓLEO					

D= diário

S= semanal

M= mensal

E= eventual (1 vez por ano)

N= nunca

Especificar (quais?):

Leguminosas _____

Hortaliças _____

Frutas _____

Tempero (óleo/sal) _____

DIA ALIMENTAR HABITUAL		
Horário	Alimento	Quantidade/porções
Desjejum _____h		
Intervalo _____h		
Almoço _____h		
Intervalo _____h		
Jantar _____h		
Ceia _____h		

Incluir forma de preparo dos alimentos – cru / cozido

Para o levantamento dos dados e aplicação da correlação (coeficiente de Pearson) foi utilizando o programa Microsoft Excel do pacote Microsoft Office 2003. Os dados foram agrupados de acordo com o valor de acidez Dornic recebida na análise físico-química do leite humano. Para tanto, foi estabelecido um grupo referente as amostras de LH aprovadas por acidez ou seja aquelas que apresentaram valores inferiores ou iguais a 8 °D e outro grupo referente as amostras rejeitadas por acidez elevada (> 8 °D).

As associações dos grupos de alimentos foram realizadas de acordo com o consumo, diário, semanal, mensal, eventual e nunca consumido dos alimentos.

Os dados obtidos foram agrupados em: leite, ovos, carne bovina, frango, peixe miúdos, leguminosas, hortaliças, fritura, refrigerantes, sucos, café, bebida, alcoólica, frutas, manteiga, margarina, banha e óleo. Os grupos foram diferenciados em aprovados e rejeitados quanto à acidez e re-agrupados em alimentos mais frequentemente consumidos (D - diário, S - semanal) e os menos frequentemente consumidos (M – mensal, E – eventual e N – nunca).

O questionário foi aplicado a 49 doadoras de leite humano, sendo 65,3% (32 doadoras) apresentaram amostras de LH com acidez ≤ 8 °D; e 17 doadoras (34,69%), com amostras acima do valor aceito para acidez (≥ 8 °D).

Foi designado um índice percentual de acordo com os alimentos e o número total de questionários aplicados. E considerou-se como diferente um índice de 20 % em relação a frequência de alimentos consumidos por grupo estabelecido.

4 Resultados e discussão

4.1 Dados microbianos

Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Das 72 amostras analisadas, 48 (66,66%) eram próprias para o consumo (≤ 8 °D). Nestas amostras a população máxima de microrganismos mesófilos aeróbios totais encontrado foi de $7,7 \times 10^6$ UFC/mL. Para o grupo das bactérias lácticas, o valor máximo encontrado

também ficou na ordem de 10^7 , sendo o valor estimado de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL. Quanto às bactérias lipolíticas, a população máxima foi de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL. Os coliformes totais foram isolados em 47,2% (34 amostras) destas amostras com acidez aprovada, sendo que a maior população ficou situada da faixa log de 1-10 NMP/mL e destas 87,5% (14 amostras) confirmaram também a presença de *E. coli*.

As amostras ácidas (> 8 °D), foram 24 ou seja (33,33%) do número total de amostras analisadas. Nestas amostras foi possível observar para os microrganismos mesófilos aeróbios totais e bactérias lácticas, contagens de 10^7 UFC/mL, sendo os valores máximos de $1,9 \times 10^7$ e $1,1 \times 10^7$, respectivamente. As bactérias lipolíticas estiveram presentes em 56,52% (13 amostras) nas quais o valor máximo obtido foi de $9,1 \times 10^5$ UFC/mL. Já para o grupo dos coliformes, foi possível detectar presença de coliformes totais em 52,94% das amostras ácidas e destas 33,33% confirmaram presença de *E. coli*.

O grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivo é considerado um importante indicador higiênico-sanitário e a sua presença pode indicar deficiência de processamento em alimentos submetidos a tratamentos térmicos, como é o caso do leite humano. Além disso, o tratamento térmico pode destruir a bactéria e o alimento não apresentar células viáveis de *S. aureus*, mas ainda conter toxinas estafilocócicas, altamente resistentes ao calor (LANCETE; BENETT, 2001). Para este microrganismo o valor máximo encontrado nas amostras ácidas, foi de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL, muito similar ao encontrado nas amostras com acidez aceitável, $1,0 \times 10^4$ UFC/mL.

A Tabela 1 apresenta o resultado microbiológico geral e os valores de acidez encontrados nas análises de leite humano ordenhado cru.

Tabela 1 – Contagens bacterianas e acidez (°D) no leite humano cru

(continua)

Amostra	Acidez (°D)	UFC/mL				NMP/mL	
		Mesófilos Aeróbios	Bactérias Lácticas	Bactérias Lipolíticas	Staphylococcus coagulase +	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
1	4	2,1x10 ²	1,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
2	3	6,3x10 ²	3,2x10 ²	<10	4x10 ²	<0,3	<0,3
3	8,5	5,2x10 ³	5,5x10 ³	<10	<1,0	9,0	<0,3
4	8,5	3,2x10 ⁵	1,5x10 ³	<10	<1,0	11x10 ²	<0,3
5	3	1,6x10 ⁶	4,7x10 ⁵	<10	<1,0	>240	<0,3
6	2	8,8x10 ³	6,0x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
7	6	5,5x10 ⁴	2,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
8	4	1,0x10 ⁶	6,0x10 ⁵	<10	6x10 ²	>240	4,0
9	5	3,4x10 ³	1,1x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
10	6	2,9x10 ²	6,0x10	<10	<1,0	7,0	<0,3
11	7	2,5x10 ⁵	5,7x10 ²	<10	<1,0	75	<0,3
12	4	4,6x10 ²	3,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
13	2	3,5x10 ⁶	1,1x10 ⁶	<10	<1,0	>240	2,3
14	5	6,8x10 ⁴	1,1x10 ³	<10	<1,0	>240	4,3
15	5	4,4x10 ⁴	2,9x10 ⁴	<10	<1,0	>240	2,3
16	4	1,2x10 ⁵	2,2x10 ³	<10	0,6x10	>240	2,3
17	9	1,4x10 ⁵	6,0x10 ³	<10	<1,0	15	2,3
18	2	2,2x10 ⁴	2,4x10 ⁴	<10	<1,0	<0,3	<0,3
19	4	2,9x10 ³	6,0x10	3,0x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
20	12,5	3,4x10 ⁵	8,6x10 ⁴	4,9x10 ⁴	<1,0	2,8	<0,3
21	7	1,1x10 ⁵	5,7x10 ²	1,9x10 ⁵	2x10 ³	24	2,3
22	3	6,1x10 ³	4,5x10 ²	6,0x10 ³	2x10 ²	<0,3	<0,3
23	2	1,2x10 ³	1,2x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
24	11	5,4x10 ³	4,4x10 ³	2,5x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
25	5	6,1x10 ³	1,6x10 ³	1,5x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
26	7	3,8x10 ³	5,1x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
27	6	6,4x10 ³	3,4x10 ³	3,0x10 ³	<1,0	110	0,3
28	9	4,2x10 ⁴	6,7x10 ³	3,4x10 ⁴	3x10 ⁴	<0,3	<0,3
29	12,5	1,9x10 ⁵	1,6x10 ⁵	8,4x10 ⁴	<1,0	0,4	<0,3
30	4	5,2x10 ²	3,5x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
31	3	3,7x10 ²	7,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
32	7	1,9x10 ³	2,9x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
33	11	2x10 ²	3,0x10	<10	<1,0	0,9	<0,3
34	12	1,0x10 ²	1,5x10	<10	<1,0	0,4	<0,3
35	3	1,2x10 ³	4,2x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3

Tabela 1 – Contagens bacterianas e acidez (°D) no leite humano cru

(continuação)

Amostra	Acidez (°D)	UFC/mL				NMP/mL	
		Mesófilos Aeróbios	Bactérias Lácticas	Bactérias Lipolíticas	Staphylococcus coagulase +	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
36	2	2,7x10 ³	1,3x10 ²	1,7x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
37	4	9,0x10 ²	2,6x10 ²	<10	<1,0	7,5	<0,3
38	3	2,3x10 ³	1,4x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
39	3	9,8x10 ²	1,3x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
40	2	6,5x10 ³	5,7x10 ²	9,0x10 ³	1,3x10	9,3	<0,3
41	5	1,4x10 ⁴	2,1x10 ³	3,0x10 ⁴	<1,0	11x10 ²	<0,3
42	5	1,2x10 ²	1,4x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
43	2	8,0x10	8,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
44	3	6,8x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	<1,0	21	2,3
45	6,5	7,0x10	1,4x10 ²	<10	<1,0	<0,3	0,9
46	5	8,3x10 ⁴	1,6x10 ³	<10	3,0x10	<0,3	21
47	9	1,7x10 ⁵	6,5x10 ²	<10	4,0x10	<0,3	>240
48	7	1,7x10 ³	8,0x10	<10	7,0x10	<0,3	21
49	7	5,1x10 ²	5,5x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
50	5	1,3x10 ²	1,0x10 ²	<10	6,5x10 ²	<0,3	<0,3
51	6	2,3x10 ³	6,0x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
52	5	6,3x10 ⁴	5,5x10 ²	<10	<1,0	<0,3	6,4
53	3	1,9x10 ³	8,2x10 ³	<10	<1,0	<0,3	0,7
54	4	4,9x10 ³	1,2x10 ⁴	<10	<1,0	0,4	0,4
55	3	1,8x10 ³	7,4x10 ³	<10	1x10 ⁴	<0,3	<0,3
56	5	1,5x10	1,7x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
57	4	2,0x10	2,0x10 ⁵	6,5x10 ⁴	<1,0	4,3	>240
58	9	1,1x10 ³	7,7x10 ³	<10	<1,0	<0,3	0,4
59	9,5	9,5x10 ³	4,0x10 ⁶	<10	<1,0	0,3	>240
60	9	1,5x10	1,1x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
61	10	3,3x10 ³	1,3x10 ⁵	3,0x10 ⁴	<1,0	<0,3	110
62	3	1,4x10 ²	5,0x10 ³	<10	<1,0	<0,3	0,4
63	12	4,5x10 ⁶	6,7x10 ³	2,8x10 ⁵	<1,0	110	<0,3
64	12	3,0x10 ²	5,0x10	<10	<1,0	0,9	<0,3
65	13	5,2x10 ⁴	3,3x10 ²	5,0x10 ³	<1,0	1,4	<0,3
66	10,5	5,0x10 ⁵	3,3x10 ³	1,3x10 ⁵	4,5x10 ³	110	<0,3
67	21	4,3x10 ²	9,0x10	<10	<1,0	2,3	<0,3
68	9	8,0x10 ⁶	4,9x10 ⁶	5,7x10 ⁵	<1,0	11x10 ²	<0,3
69	9	1,9x10 ⁷	1,1x10 ⁷	1,7x10 ⁵	<1,0	46	<0,3
70	14,5	4,3x10 ⁴	2,3x10 ³	9,0x10 ⁴	<1,0	2,8	<0,3
71	10,5	1,9x10 ⁶	4,6x10 ⁵	9,1x10 ⁵	<1,0	11x10 ²	<0,3
72	12	7,7x10 ⁶	3,5x10 ⁵	3,6x10 ⁵	<1,0	>240	<0,3

Com o propósito de evidenciar a correlação entre o crescimento microbiano e os valores encontrados na acidez Dornic, são apresentados alguns exemplos de amostras de LH analisadas neste estudo com contagem microbiana elevada e valores baixos de acidez Dornic.

Em relação aos parâmetros de acidez e contagens microbianas, podemos evidenciar os resultados obtidos nas amostras 5 e 8 que possuem valores de acidez iguais a 3 e 4 °D, respectivamente. Estes valores de acidez são considerados aprovados para o consumo e baixos, em relação ao limite estabelecido de 8 °D e as contagens microbianas para o grupo de microrganismos mesófilos aeróbios totais (10^6 UFC/mL) e bactérias lácticas (10^5 UFC/mL). O mesmo fato pode ser notado nas amostras 13 e 18, ambas com valores de acidez igual a 2 °D e com contagens microbiana elevadas, tendo a amostra 13 contagens na ordem de 10^6 UFC/mL para os grupos dos microrganismos mesófilos e bactérias lácticas e a amostra 18, contagens na ordem de 10^6 UFC/mL para os mesmos grupos de microrganismos.

Das amostras citadas acima, a 5, 8 e 13 apresentaram elevada contagem de coliformes totais (> 240 NMP/mL), sendo que nas amostras 8 e 13 foi detectada a presença de *Escherichia coli*.

A literatura relata o desenvolvimento de acidez no leite humano como resultado da produção de ácido láctico a partir da degradação da lactose por microrganismos (NOVAK, 2007; BORTOLOZO, 2004). No entanto, este trabalho demonstra exceções a essa regra. É possível verificar valores de acidez Dornic baixos em amostras com contagens microbianas elevadas, deixando supor que a origem da acidez não seja somente microbiana e sim relacionada a outros fatores que merecem ser estudados.

De acordo com as exceções encontradas e para melhor visualização dos dados, os valores encontrados foram separados em grupos: amostras aprovadas para acidez (≤ 8 °D) Tabela 2, e amostras rejeitadas por acidez (> 8 °D) Tabela 3.

Tabela 2 – Amostras aprovadas para acidez (≤ 8 °D) e contagens microbianas

(continua)

Amostras	Acidez (°D)	UFC/mL				NMP/mL	
		Mesófilos Aeróbios	Bactérias Láticas	Bactérias Lipolíticas	<i>Staphylococcus</i> coagulase +	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
5	3	1,6x10 ⁶	4,7x10 ⁵	<10	<1,0	>240	<0,3
6	2	8,8x10 ³	6x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
7	6	5,5x10 ⁴	2,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
8	4	1x10 ⁶	6x10 ⁵	<10	6,0x10 ²	>240	4
9	5	3,4x10 ³	1,1x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
10	6	2,9x10 ²	6,0x10	<10	<1,0	7	<0,3
11	7	2,5x10 ⁵	5,7x10 ²	<10	<1,0	75	<0,3
12	4	4,6x10 ²	3,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
13	2	3,5x10 ⁶	1,1x10 ⁶	<10	<1,0	>240	2,3
14	5	6,8x10 ⁴	1,1x10 ³	<10	<1,0	>240	4,3
15	5	4,4x10 ⁴	2,9x10 ⁴	<10	<1,0	>240	2,3
16	4	1,2x10 ⁵	2,2x10 ³	<10	0,6x10	>240	2,3
18	2	2,2x10 ⁴	2,4x10 ⁴	<10	<1,0	<0,3	<0,3
19	4	2,9x10 ³	6,0x10	3x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
21	7	1,1x10 ⁵	5,7x10 ²	1,9x10 ⁵	2,0x10 ³	24	2,3
22	3	6,1x10 ³	4,5x10 ²	6,0x10 ³	2,0x10 ²	<0,3	<0,3
23	2	1,2x10 ³	1,2x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
25	5	6,1x10 ³	1,6x10 ³	1,5x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
26	7	3,8x10 ³	5,1x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
27	6	6,4x10 ³	3,4x10 ³	3,0x10 ³	<1,0	110	0,3
30	4	5,2x10 ²	3,5x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
31	3	3,7x10 ²	7,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
32	7	1,9x10 ³	2,9x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
35	3	1,2x10 ³	4,2x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
36	2	2,7x10 ³	1,3x10 ²	1,7x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
37	4	9,0x10 ²	2,6x10 ²	<10	<1,0	7,5	<0,3
38	3	2,3x10 ³	1,4x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
39	3	9,8x10 ²	1,3x10 ³	<10	<1,0	<0,3	<0,3
40	2	6,5x10 ³	5,7x10 ²	9x10 ³	1,3x10	9,3	<0,3
41	5	1,4x10 ⁴	2,1x10 ³	3x10 ⁴	<1,0	110	<0,3
42	5	1,2x10 ²	1,4x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
43	2	8,0x10	8,0x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
44	3	6,8x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	<1,0	21	2,3
45	6,5	7,0x10	1,4x10 ²	<10	<1,0	<0,3	0,9
46	5	8,3x10 ⁴	1,6x10 ³	<10	3,0x10	<0,3	21
48	7	1,7x10 ³	8,0x10	<10	7,0x10	<0,3	21
49	7	5,1x10 ²	5,5x10	<10	<1,0	<0,3	<0,3
50	5	1,3x10 ²	1,0x10 ²	<10	6,5x10 ²	<0,3	<0,3
51	6	2,3x10 ³	6,0x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3

Tabela 2 – Amostras aprovadas para acidez (≤ 8 °D) e contagens microbianas

(conclusão)							
Amostras	Acidez (°D)	UFC/mL				NMP/mL	
		Mesófilos Aeróbios	Bactérias Lácticas	Bactérias Lipolíticas	<i>Staphylococcus</i> coagulase +	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
52	5	$6,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^2$	<10	<1,0	<0,3	6,4
53	3	$1,9 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	<10	<1,0	<0,3	0,7
54	4	$4,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	<10	<1,0	0,4	0,4
55	3	$1,8 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$	<10	1×10^4	<0,3	<0,3
56	5	$1,5 \times 10$	$1,7 \times 10^2$	<10	<1,0	<0,3	<0,3
57	4	$2,0 \times 10$	$2,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	<1,0	4,3	>240
62	3	$1,4 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3$	<10	<1,0	<0,3	0,4

Na Tabela 2 observa-se que as amostras 41, 44, 46, 52, 54 e 57 apresentaram acidez dentro do aceitável, contudo as contagens de alguns grupos bacterianos foram elevadas, na ordem de 10^4 UFC/mL. A amostra 57 apresentou contagem de $2,0 \times 10^5$ UFC/mL de bactérias lácticas. Já o valor da acidez variou entre 3° e 5° D. Algumas amostras, como a 26 tiveram acidez de 7° D, mas contagens mais baixas.

Na análise da Tabela 2 ainda é possível verificar amostras que apresentam acidez próximo ao limite estabelecido (8 °D) com contagens microbianas bem baixas. Este caso é notado nas amostras 10, 45, 49 e 56, as quais apresentam acidez entre 5 e 7 °D e as contagens microbianas dos grupos mesófilos aeróbios totais e bactérias lácticas ficam entre 10^1 e 10^2 UFC/mL. Nenhuma destas amostras apresentou crescimento microbiano para o grupo das bactérias lipolíticas e *Staphylococcus* coagulase positiva, porém a amostra 10 apresentou uma baixa contagem de coliformes totais (7 NMP/mL) e a amostra 56 teve confirmação de presença de *E.coli* com um valor de 0,9 NMP/mL.

Do total de amostras da Tabela 2 (48 amostras), 20,83% apresentaram crescimento positivo para microrganismos lipolíticos e 18,75% confirmaram presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

O valor máximo encontrado para o grupo das bactérias lipolíticas foi de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL, enquanto para o *Staphylococcus* coagulase positiva este valor não passou de 1×10^4 UFC/mL.

Para o grupo dos coliformes, foi possível observar presença de coliformes totais em 33,33% do total de amostras com acidez aprovada e o mesmo índice percentual foi indicado para *Escherichia coli*.

No grupo de amostras com acidez acima de 8 °D como demonstra a Tabela 3 a mesma situação entre acidez e contagem microbiana é observada.

Tabela 3 – Amostras rejeitadas para acidez (>8 °D) e contagens microbianas

Amostras	Acidez (°D)	UFC/mL				NMP/mL	
		Mesófilos Aeróbios	Bactérias Lácticas	Bactérias Lipolíticas	<i>Staphylococcus</i> coagulase +	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
3	8,5	5,2x10 ³	5,5x10 ³	<10	<1,0	9	<0,3
4	8,5	3,2x10 ⁵	1,5x10 ³	<10	<1,0	11x10 ²	<0,3
17	9	1,4x10 ⁵	6x10 ³	<10	<1,0	15	2,3
20	12,5	3,4x10 ⁵	8,6x10 ⁴	4,9x10 ⁴	<1,0	2,8	<0,3
24	11	5,4x10 ³	4,4x10 ³	2,5x10 ³	<1,0	<0,3	<0,3
28	9	4,2x10 ⁴	6,7x10 ³	3,4x10 ⁴	3x10 ⁴	<0,3	<0,3
29	12,5	1,9x10 ⁵	1,6x10 ⁵	8,4x10 ⁴	<1,0	0,4	<0,3
33	11	2x10 ²	3,0x10	<10	<1,0	0,9	<0,3
34	12	1x10 ²	1,5x10	<10	<1,0	0,4	<0,3
47	9	1,7x10 ⁵	6,5x10 ²	<10	4,0x10	<0,3	>240
58	9	1,1x10 ³	7,7x10 ³	<10	<1,0	<0,3	0,4
59	9,5	9,5x10 ³	4x10 ⁶	<10	<1,0	0,3	>240
60	9	1,5x10	1,1x10 ²	<10	<1,0	<0,3	<0,3
61	10	3,3x10 ³	1,3x10 ⁵	3x10 ⁴	<1,0	<0,3	110
63	12	4,5x10 ⁶	6,7x10 ³	2,8x10 ⁵	<1,0	110	<0,3
64	12	3,0x10 ²	5,0x10	<10	<1,0	0,9	<0,3
65	13	5,2x10 ⁴	3,3x10 ²	5,0x10 ³	<1,0	1,4	<0,3
66	10,5	5,0x10 ⁵	3,3x10 ³	1,3x10 ⁵	4,5x10 ³	110	<0,3
67	21	4,3x10 ²	9,0x10	<10	<1,0	2,3	<0,3
68	9	8,0x10 ⁶	4,9x10 ⁶	5,7x10 ⁵	<1,0	110	<0,3
69	9	1,9x10 ⁷	1,1x10 ⁷	1,7x10 ⁵	<1,0	46	<0,3
70	14,5	4,3x10 ⁴	2,3x10 ³	9,0x10 ⁴	<1,0	2,8	<0,3
71	10,5	1,9x10 ⁶	4,6x10 ⁵	9,1x10 ⁵	<1,0	110	<0,3
72	12	7,7x10 ⁶	3,5x10 ⁵	3,6x10 ⁵	<1,0	>240	<0,3

Como indica a Tabela 3, amostras com acidez elevada apresentam contagens microbianas baixas como é o caso das amostras 33, 34, 60, 64 e 67. Tais amostras,

embora rejeitadas por acidez, apresentavam contagens microbianas muito menores do que as observadas em algumas das amostras aceitáveis apresentadas na Tabela 2.

Estas amostras apresentaram acidez entre 9 e 21 graus Dornic e as contagens microbianas não passaram da ordem de 10^2 UFC/mL para nenhum dos 5 grupos pesquisados. Destas amostras, salienta-se a 67 cuja acidez foi determinada em 21 °D e as contagens microbianas ficaram estabelecidas em: $4,3 \times 10^2$ UFC/mL para microrganismos mesófilos aeróbios totais; $9,0 \times 10$ UFC/mL para o grupo das bactérias láctica; para o grupo das bactérias lipolíticas e dos *Staphylococcus* coagulase positiva nenhum microrganismo foi detectado nesta amostra. Já para o grupo dos coliformes foi possível verificar 2,3 NMP/mL para os totais e $<0,3$ para *E.coli*. Pelo elevado valor de acidez obtido nesta amostra, a população microbiana encontrada em todos os grupos pesquisados foi considerada baixa em relação a outras amostras.

O leite humano contém substâncias protetoras porém, tal fato não garante segurança contra presença de microrganismos, podendo servir de veículo para bactérias patogênicas (ALMEIDA, 2004). Segundo a Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção de leite com boa qualidade deve-se ter o controle higiênico-sanitário da coleta e da manipulação do produto e a conservação do mesmo sob baixas temperaturas durante todas as fases do processamento, até a pasteurização e estocagem.

4.1.1 Pesquisa Bactérias do Grupo Coliforme

Na Figura 2 observa-se a distribuição da população de coliformes totais em amostras de leite humano. Em 47,2% (34 amostras) das amostras pode-se observar presença deste grupo de microrganismos, estimada pela Tabela do Número Mais Provável. O maior número (45,45%) de amostras situou-se na faixa de 1-10 NMP/mL. Das 15 amostras encontradas nessa faixa, 66,66% apresentaram acidez elevada.

Em BLH do Estado de São Paulo, Rodrigues (2005) verificou incidência de 20% de coliformes totais no leite cru. valor este muito inferior ao encontrado no presente estudo (47,2%). Castro (2006) detectou coliformes totais em 75% das amostras analisadas, sendo a maior ocorrência na faixa de 1 a 99 NMP/mL. Os BLHs estudados pertenciam a municípios diferentes, o que sugere que a contaminação por esse grupo

de microrganismos pode ser bastante variável, tanto com a unidade geográfica quanto pela qualidade do treinamento dado às nutrizes sobre a coleta adequada do LH.

Figura 2 – Distribuição da população de coliformes totais em leite humano cru

No presente estudo 5 amostras positivas (14,7%) para o grupo coliformes totais situaram-se na faixa de 11 a 100 NMP/mL. Destas, 2 amostras (5,88%) possuíam valores de acidez $> 8^{\circ}\text{D}$, sendo rejeitadas, porém outras 3 foram aprovadas com as mesmas contagens. O número de coliformes totais foi muito elevado em 41,17% (14 amostras) do total analisado, índice este situado na faixa de 101 a > 240 NMP/mL. Destas, 6 amostras (42,85%) apresentaram valores de acidez acima do permitido para consumo humano.

Relatos de pesquisas mostram que também no leite pasteurizado os resultados diferem. Enquanto Pontes, Ivasaki e Oliveira (2003) encontraram coliformes totais em 33,3% das amostras de leite humano pasteurizado, Bortolozo et al., (2004), não detectaram coliformes totais em nenhuma das amostras.

Entre as enterobactérias, destaca-se a importância do grupo coliforme no controle de qualidade microbiológico dos Bancos de Leite Humano, visto que sua presença pode indicar contaminação de origem fecal.

Pesquisas têm mostrado que a contaminação por coliformes pode ser proveniente do ambiente (SERAFINI et al., 2003).

Lin et al., (1988) analisou amostras de LH individuais e *pool* de amostras de doadoras distintas. Nas amostras do primeiro caso não foi detectada presença de coliformes totais, porém na segunda situação apresentada foi possível verificar uma média de $6,8 \times 10^4$ UFC/mL.

O presente estudo mostra que 61,76% (21 amostras) das amostras positivas para o grupo dos coliformes totais confirmaram presença de *E. coli*, como indica a Figura 3.

Setenta e seis por cento das amostras positivas para *E. coli* apresentaram-se na faixa de 1-10 NMP/mL. E 14,28% (3 amostras) tiveram índices nas faixa de 101 a >240 UFC/mL para *Escherichia coli*. Somente uma amostra desta faixa populacional apresentava valor de acidez aceitável.

Figura 3 - Distribuição da população de *Escherichia coli* em leite humano cru

Serafini et al., (2003), encontraram valores percentuais inferiores para *E. coli* quando comparado com os do presente estudo. Este microrganismo esteve presente em 21,1% das amostras de leite cru e em 5,6 % das amostras pasteurizadas, mostrando que a eficiência do processo de pasteurização pode ser comprometida por uma carga microbiana inicial elevada, .

Castro (2006) detectou *E. coli* em 50% das amostras de leite cru analisadas em um BLH do estado de São Paulo, embora apresentando populações na faixa de 1 a 99 NMP/mL em 93,33%, contagens estas consideradas baixas. Ainda em BLH no estado de São Paulo, Rodrigues (2005) encontrou uma menor incidência de *E. coli*, 13,33% do total de amostras de leite cru analisadas. Apesar de ser um indicador de contaminação fecal, a sua ausência na grande maioria das amostras demonstra que a qualidade higiênico-sanitária do leite cru coletado foi boa, segundo Rodrigues (2005).

Das amostras de LH *in natura* analisadas por Assis Neto et al., (2001), somente 24% apresentaram valores iguais a <0,3 NMP/mL para coliformes totais. Vinte e oito por cento das amostras positivas para coliformes totais apresentaram contagens superiores a 240 NMP/mL. Já para a pesquisa de *E. coli*, 52% das amostras analisadas, apresentaram-se positivas, porém somente 16% com contagens acima de 240 NMP/mL.

4.1.2 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva

Como indica a Figura 4, em 18,06% (13 amostras) das amostras analisadas houve presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo a maior frequência da população situada na faixa entre 1 e 1,9 Log UFC/mL, o que significa uma população pequena na maioria das amostras. Dentre o total das amostras ácidas (24 amostras), 29,18% foram positivas, com a maior frequência na faixa entre 2 e 2,9 Log UFC/mL, (16,67%) do total das amostras ácidas.

É possível observar também uma baixa incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva nas faixas 3 a 3,9 e 4 a 4,9 Log UFC/mL, sendo o valor percentual total encontrado igual a 2,78 para ambas as faixas. De um modo geral, tanto no leite ácido quanto no não ácido as contagens de *Staphylococcus* foram baixas.

Figura 4 – Distribuição da população de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite cru

Sabe-se que os *Staphylococcus* coagulase positivos não são acidificantes do leite, mas algumas cepas produzem enterotoxinas termoestáveis, que resistem até 100° C por 3 min. (NOVAK et al., 2000). Portanto, a temperatura usual utilizada nos Bancos de Leite Humano de 65°C por 30 minutos, poderia eliminar os *Staphylococcus* existentes, porém não eliminaria a eventual toxina produzida (NOVAK et al., 2000).

Pelos dados obtidos, conforme Figura 4, nota-se que a qualidade geral das amostras quanto à pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva foi boa. A presença deste microrganismo em algumas amostras pode ser explicada pela colonização deste na pele, seios ou até mesmo pela sua presença em utensílios com condições de higiene insatisfatórias empregados durante a ordenha (NOVAK et al., 2000).

Segundo Novak et al., 2000, contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 2 log UFC/mL em leite humano podem ser um indicador de mastite. Valores superiores a esse índice só foram encontrados em 2,78% do total de amostras analisadas e em 4,17% das amostras com acidez elevada.

Rodrigues (2005) encontrou 35% das amostras de leite cru com população de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 2 log UFC/mL. Valor este superior ao encontrado por Castro (2006), que obteve somente 21,42% do total de amostras analisadas apresentaram contagens acima de 10² UFC/mL para este microrganismo.

Estudos desenvolvidos por Assis Neto et al., (2001) utilizando leite humano “*in natura*” apresentaram 32% das amostras analisadas, contagens de *Staphylococcus sp* com valores que foram maiores do que 6 log UFC/mL .

Pontes, Iwasaki e Oliveira (2003) encontraram presença de estafilococos em 3,7% das amostras de leite humano pasteurizado analisadas, sendo que este índice é referente a amostras procedentes do berçário de um hospital público e apresentaram cepas coagulase positiva.

Bortolozo et al., (2004) avaliaram o padrão microbiológico e de acidez do leite humano processado em BLH, em diferentes tempos (zero, 12 e 24 horas). Quanto ao microrganismo em questão, *Staphylococcus coagulase positiva*, os autores verificaram a manutenção do parâmetro microbiológico em < 1,0 log UFC/mL.

4.1.3 Microrganismos Mesófilos Aeróbios Totais

A distribuição da frequência da população de mesófilos aeróbios totais nas amostras pode ser observada na Figura 5, onde a maioria das amostras (31,94%) apresentou população microbiana na faixa 3-3,9 Log UFC/mL. Porém, nas amostras ácidas o maior índice percentual, 25%, ficou estabelecido na faixa 5-5,9 Log UFC/mL.

Figura 5 – Distribuição da população de microrganismos mesófilos aeróbios totais (Log UFC/mL)

A faixa de variação de contagem de mesófilos neste estudo, ficou entre 10^1 e 10^7 UFC/mL. Silva e Almeida (2001) encontraram faixa de variação idêntica, porém a maior frequência ficou estabelecida na faixa de 3 e 4 log UFC/mL. Estes mesmos valores foram encontrados por Rodrigues (2005) em 41,66% do total de amostras analisadas.

Estudos desenvolvidos por Novak (2007) também encontraram faixa de variação semelhante, entre 2 e 7 log UFC/mL para os microrganismos mesófilos, com maior frequência no intervalo de 4 e 5 log UFC/mL, o que é maior do que o encontrado neste estudo e nas pesquisas de Silva e Almeida (2001) e Rodrigues (2005), porém semelhante a Castro (2006). Nesse último estudo, populações mais altas foram observadas em 1,72% das amostras, que atingiram valores de até 8 log UFC/mL.

Segundo Lin et al., (1988) a contagem de microrganismos mesófilos média foi de 4,2 log UFC/mL para amostras de LH analisadas individualmente. Para o *pool* de leite materno, verificou-se uma média de 6,5 log UFC/mL para este mesmo grupo.

Bortolozo et al., (2004) demonstraram o crescimento bacteriano e a elevação da acidez Dornic conforme o tempo de armazenagem do leite humano. A contagem microbiana para microrganismos mesófilos aumentou atingindo índices de acidez inadequados para o consumo. O estudo salienta que há possibilidade de contaminação do leite pasteurizado, após sua distribuição para o consumo.

Pontes, Iwasaki e Oliveira (2003) encontraram contagens de bactérias aeróbias mesófilas acima de 1,0 log UFC/mL em 48,2 % das amostras analisadas e concluíram que existiram falhas na observância das Boas Práticas de Manipulação em algum momento do processamento, permitindo que o leite se apresentasse contaminado no momento da distribuição.

No presente estudo, 98,6% das amostras apresentaram contagens para microrganismos mesófilos, resultado semelhante ao estudo de Rodrigues (2005) e Assis Neto et al., (2001) os quais encontraram índices de 96,6% e 96% para o mesmo grupo de microrganismo.

Novak (2007) analisou 200 amostras de leite humano cru, destas 96% estavam dentro dos valores de acidez aceitáveis para o consumo. Novak relata que cada intervalo crescente de acidez Dornic correspondeu a um valor maior e diferente de

população de mesófilos. A correlação entre as variáveis foi de $R=0,948$ para o total das 200 amostras e $R=0,959$ para as amostras com acidez menor ou igual a 8 graus Dornic. O presente estudo analisou 72 amostras, das quais 33,33% das amostras apresentavam valores elevados de acidez ($>8^{\circ}\text{D}$), ou seja, rejeitados para o consumo.

Não foi possível observar no presente estudo um aumento gradativo entre acidez Dornic e população microbiana como a encontrada por Novak (2007). Em ambos estudos o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado, determinado pelo pacote estatístico SPSS para Windows. O nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$. Porém no estudo de Novak (2007) a correlação entre as variáveis foi significativa ($p<0,001$), diferente do encontrado no presente estudo, que apresentou valor de 0,215 para correlação de Pearson. Tal dado se refere ao total de amostras analisadas. A Tabela 4 e a Figura 6 demonstram os valores encontrados.

Tabela 4 – Correlação de dados referentes a todas as amostras analisadas

Correlação de Pearson			
		Acidez Dornic ($^{\circ}\text{D}$)	População de Mesófilos (log)
Acidez Dornic ($^{\circ}\text{D}$)	Correlação	1	0,215
	p-valor	...	0,070
	n	72	72
População de Mesófilos (log)	Correlação	0,215	1
	p-valor	0,070	...
	n	72	72

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

A Tabela 4 mostra os resultados do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos. Pode-se observar que para um número de amostra ($n=72$), o coeficiente de correlação amostral foi de 0,215, indicando uma baixa correlação. Como $p\text{-valor} > \alpha=5\%$ então não rejeita-se H_0 , indicando que estatisticamente não existe uma relação linear entre as variáveis envolvida no estudo (α : nível de significância).

Figura 6 – Tendência Linear entre as variáveis Acidez Dornic e População de mesófilos para o total de amostras analisadas

Adicionalmente foi observado por meio da Figura 6 que não existe uma tendência linear entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos apresentada em logaritmo na base 10. A Figura 6, apresenta um ponto deslocado a direita do gráfico que representa a amostra 67, com acidez igual a 21°D e contagem de mesófilos igual a 2,6 log UFC/mL.

Para as amostras aprovadas ($n=48$) na análise de acidez Dornic o valor apresentado para Correlação de Pearson é -0,015 valor este muito inferior do esperado para uma correlação significativa, ou seja próximo a 1. A Tabela 5 demonstra os dados encontrados no estudo de correlação entre essas variáveis.

Tabela 5 – Correlação de dados referentes as amostras aprovadas ($\leq 8^{\circ}\text{D}$) na análise de acidez Dornic

Correlação de Pearson			
		Acidez Dornic (°D)	População de Mesófilos (log)
Acidez Dornic (°D)	Correlação	1	-0,0154
	p-valor	...	0,9174
	n	48	48
População de Mesófilos (log)	Correlação	-0,015	1
	p-valor	0,917	...
	n	48	48

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

A Tabela 5 mostra os resultados do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis acidez Dornic (para amostras com acidez $\leq 8^{\circ}\text{D}$) e população de mesófilos. Pode-se observar que para um número de amostra ($n=48$), o coeficiente de correlação amostral foi de -0,015, indicando a inexistência de correlação estatística. Também a Tabela 5 testa as hipóteses: $\begin{cases} H_0 : \rho = 0 \\ H_1 : \rho \neq 0 \end{cases}$. Como p-valor $> \alpha=5\%$ então não rejeita-se H_0 , indicando que estatisticamente não existe uma relação linear entre as variáveis envolvida no estudo (α : nível de significância).

A Figura 7 demonstra uma distribuição constante dos dados. Apresentando no eixo x valores de 2 a 8°D e no eixo y valores da população de mesófilos apresentados em log na base 10.

Figura 7 – Tendência Linear entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos para amostras com acidez $\leq 8^{\circ}\text{D}$

Para as amostras de leite humano com acidez $> 8^{\circ}\text{D}$ (rejeitadas), o coeficiente de correlação de Pearson apresentou valor negativo indicando não-correlação estatística. O número de amostras para esse grupo é igual a 24 e o p-valor é de 0,3989 para um nível de significância de $< 0,05$. A Tabela 6 adicionalmente com a Figura 8 demonstram os dados encontrados.

Tabela 6 – Correlação de dados referentes as amostras rejeitadas ($>8^{\circ}\text{D}$) na análise de acidez Dornic

Correlação de Pearson			
		Acidez Dornic ($^{\circ}\text{D}$)	População de Mesófilos (log)
Acidez Dornic ($^{\circ}\text{D}$)	Correlação	1	-0,1804
	p-valor	...	0,3989
	n	24	24
População de Mesófilos (log)	Correlação	-0,1804	1
	p-valor	0,3989	...
	n	24	24

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

Figura 8 – Tendência Linear entre as variáveis acidez Dornic e população de mesófilos para amostras com acidez $> 8^{\circ}\text{D}$

Observando a Figura 8 é possível verificar uma concentração de amostras entre 8 e 13°D de acidez e variando quanto à população de microrganismos mesófilos aeróbios totais entre 2 e 7 log UFC/mL. Destacam-se dois pontos nesta figura, o primeiro, no lado extremo direito do gráfico, refere-se à amostra 67 e o segundo ponto encontrado no limite inferior do gráfico, que é representado pela amostra 60, que possui 9°D de acidez e contagem de mesófilos igual a 2,2 log UFC/mL.

Os dados estatísticos foram demonstrados apenas para o grupo dos microrganismos mesófilos aeróbios totais, pois o grupos das bactérias lácticas

apresentaram contagens muito similares ao do grupo mesófilos para a quase totalidade das amostras analisadas não havendo diferença significativa tanto no modo descritivo (Tabela 1) quanto no modo ilustrativo (Figura 6) para ser contemplado neste estudo.

Os dados numéricos do grupo de microrganismos mesófilos foram os escolhidos devido a existência de um estudo já publicado para a comparação dos dados. Mas a ausência de correlação é extensiva aos outros grupos bacterianos estudados no presente trabalho (dados não mostrados).

4.1.4 Bactérias Lácticas

Neste estudo, conforme Tabela 1, o resultado obtido foi de 100% de presença deste grupo nas amostras analisadas. As contagens microbianas porém apresentaram uma grande variação entre 1 e 10^8 UFC/mL.

É possível observar através da Figura 9, maior frequência da população de bactérias lácticas na faixa Log de 3 a 3,9 UFC/mL, 30,56%. Este índice permanece elevado quando observamos as amostras com valor elevado de acidez, dentre as quais 29,17% do total de amostras ácidas analisadas localizam-se nesta mesma faixa populacional.

Verificando as amostras com acidez elevada, o índice percentual superou o total de amostras analisadas nas faixas de contagem (Log UFC/mL) iguais a 5-5,9 e 7-7,9, sendo de 16,67% e 4,17% nas faixas respectivas, contra 9,72% e 1,39% das amostras totais na mesma ordem estabelecida.

Em relação à distribuição da população das bactérias lácticas, é possível notar uma maior concentração entre a primeira e terceira faixa populacional mostrada na Figura 9. Localizam-se na faixa de contagem (Log UFC/mL) 2-2,9 e 3-3,9, 59,73% do total de amostras analisadas.

Conforme Tabela 1, observa-se que a contagem populacional do grupo bactérias lácticas variou proporcionalmente quando comparado com o grupo de microrganismos mesófilos aeróbios totais. Tal similaridade é observada em 79,17% das amostras analisadas, ou seja apenas 15 amostras (20, 83%) apresentam uma diferença de 2 ciclos logarítmicos quando comparadas com os microrganismos mesófilos.

Figura 9 – Distribuição da população de bactérias lácticas em amostras de leite cru (Log UFC/mL)

Para o grupo das bactérias lácticas, não foi verificada correlação entre população microbiana e acidez em algumas amostras. Isso pode ser claramente visto quando observadas, na Tabela 1, as amostras 33, 34, 6 e 67. Tais amostras apresentam valores de acidez elevados em: 11, 12, 12 e 21 °D respectivamente e populações microbianas bem baixas entre 15 e 90 UFC/mL de leite cru analisado. O inverso também é verificado nas amostras 5 e 13, estas apresentam valores de acidez em 2 e 3 °D considerados baixos, comparados ao limite estabelecido de 8 °D e contagens microbianas elevadas, situando-se em $1,1 \times 10^6$ e $4,7 \times 10^5$ UFC/mL nas amostras respectivas.

A literatura especializada não contempla trabalhos científicos com pesquisa de bactérias lácticas em leite humano, impedindo assim a comparação com os resultados do presente estudo.

4.1.5 Bactérias Lipolíticas

A Figura 10 permite verificar que as contagens para microrganismos lipolíticos se concentraram na faixa entre 3 e 5 log UFC/mL.

Figura 10 – Distribuição da população de microrganismos lipolíticos nas amostras de LH cru

A maior contagem para o grupo dos microrganismos lipolíticos foi de 5,9 log UFC/mL (amostra 71), nesta amostra o valor de acidez estava em 10,5 °D – valor este acima do limite estabelecido para amostras aprovadas para o consumo.

Dentre as 24 amostras de leite humano com acidez acima de 8 °D, 51,16% apresentaram contagens para o grupo das bactérias lipolíticas, enquanto somente 16,66% de amostras com acidez aceitável apresentaram contagem para este grupo de microrganismo.

A correlação entre acidez Dornic e as bactérias lipolíticas não pode ser estabelecida visto que amostras com valores baixos de acidez (2 °D), como é o caso da amostra número 36, apresentam valores na ordem de 3 log UFC/mL e está mesma faixa populacional pode ser observada em amostras com valores de acidez elevados como o apresentado pela amostra número 65 a qual possui valor de acidez igual a 13 °D e contagem microbiana igual a 3,7 log UFC/mL.

Para estabelecer tal correlação outros estudos devem ser realizados a fim de proporcionar maior discussão de dados com o atual estudo.

Através do presente estudo pode-se afirmar que, aparentemente, microrganismos lipolíticos estão mais frequentemente presentes em amostras com acidez elevada.

4.2 Dados de consumo de alimentos

Das 72 amostras analisadas, foi possível abordar para o inquérito alimentar, 49 mulheres lactantes que estavam cadastradas no BLH. O número não chegou a sua totalidade devido a doações transitórias ou únicas, às quais não se tinha mais contato com a doadora; outro motivo foi a ocorrência de lactantes com recém-nascidos prematuros - que procuram doar o leite pensando não somente no ato solidário e sim também pelo conforto em esvaziar as mamas enquanto não consegue amamentar o filho e que vivenciaram durante a execução deste trabalho, o óbito de lactentes, fato que impediu a abordagem das mães para realização da entrevista. Do total de 49, 32 foram referentes às amostras aprovadas e 17 questionários para as rejeitadas.

Durante a execução deste trabalho, foi possível notar que muitas amostras de leite humano recebidas no Banco de Leite eram desprezadas por apresentarem sujidades como: pêlo, cabelo, fiapos de tecido, entre outros. Sendo desta forma, um volume mínimo de leite a ser pasteurizado.

A Tabela 7 demonstra os dados agrupados e calculados em porcentagem.

Tabela 7 - Distribuição da frequência de consumo alimentar de lactantes doadoras de LH

Grupo	Frequência alimentar (%)									
	Grupo referente as amostras de LH aprovadas por acidez					Grupo referente as amostra de LH rejeitadas por acidez				
	D	S	M	E	N	D	S	M	E	N
Leite	87,50	3,13	...	...	9,38	76,47	17,65	5,88	...	...
Ovos	6,25	68,75	18,75	...	6,25	11,76	64,71	11,76	...	11,76
Carne Bovina	50,00	50,00	...	...	...	17,65	82,35	...	...	...
Frango	6,25	84,38	...	...	9,38	5,88	94,12	...	...	...
Peixe	...	3,13	68,75	9,38	18,75	...	...	82,35	...	17,65
Miúdos	...	25,00	18,75	21,88	34,38	...	...	5,88	47,06	47,06
Leguminosas	87,50	12,50	...	...	...	70,59	23,53	...	...	5,88
Hortaliças	75,00	18,75	...	...	6,25	47,06	52,94	...	...	...
Doces	28,13	43,75	6,25	...	21,88	47,06	41,18	...	...	11,76
Fritura	12,50	65,63	12,50	6,25	3,13	11,76	76,47	5,88	...	5,88
Refrigerantes	9,38	31,25	...	...	59,38	...	58,82	5,88	...	35,29
Sucos	87,50	12,50	...	...	...	70,59	17,65	...	...	11,76
Café	34,38	12,50	3,13	...	53,13	17,65	47,06	...	...	29,41
Beb. alcoólica	...	...	6,25	...	93,75	...	...	5,88	...	94,12
Frutas	62,50	31,25	3,13	...	3,13	64,71	29,41	...	...	5,88
Manteiga	3,13	3,13	3,13	6,25	84,38	...	11,76	5,88	...	82,35
Margarina	75,00	9,38	3,13	...	12,50	47,06	11,76	...	...	41,18
Banha	...	...	...	...	100,00	...	...	...	...	100,00
Óleo	96,88	...	...	...	3,13	100,00	...	...	...	...

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

D – consumo diário;

S – consumo semanal;

M – consumo mensal;

E – consumo eventual (1 vez por ano);

N – nunca consome.

De acordo com os dados encontrados foram correlacionados os valores de consumo de alimentos encontrados com os valores de acidez determinados nas amostras de leite humano. Para tal, os índices percentuais foram re-agrupados conforme Tabela 8 em: mais freqüentes (para a soma daqueles alimentos consumidos com frequência alimentar diária e semanal pelas lactantes) e menos freqüentes (para alimentos consumidos mensalmente, eventualmente e não consumidos pelo grupo de mulheres estudado).

Como indicado na Tabela 8, os índices percentuais encontrados aparecem dentro da faixa estabelecida de 20% de diferença entre as colunas mais freqüentes e menos freqüentes com exceção do alimento listado, miúdos que aparece como alimento menos frequentemente consumido em 75% das lactantes entrevistadas que possuíam amostras com acidez aprovada; este índice é de 100% para lactantes que possuíam amostras ácidas.

Os valores apresentam-se iguais quanto à freqüência de consumo para os alimentos: carne bovina, bebida alcoólica e banha. E índice percentual muito próximo para os demais alimentos como: leite, ovos, hortaliças e refrigerantes.

Tabela 8 - Dados agrupados em maior e menor freqüência de consumo

Grupo/alimento	Grupo referente as amostras de LH aprovadas por acidez		Grupo referente as amostras de LH rejeitadas por acidez	
	1	2	1	2
Leite	90,63	9,38	94,12	5,88
Ovos	75,00	25,00	76,47	23,53
Carne bovina	100,00	...	100,00	...
Frango	90,63	9,38	100,00	...
Peixe	3,13	96,88	...	100,00
Miúdos	25,00	75,00	...	100,00
Leguminosas	100,00	...	94,12	5,88
Hortaliças	93,75	6,25	100,00	...
Doces	71,88	28,13	88,24	11,76
Fritura	78,13	21,88	88,24	11,76
Refrigerantes	40,63	59,38	58,82	41,18
Sucos	100,00	...	88,24	11,76
Café	46,88	56,25	64,71	29,41
Beb. alcoólica	...	100,00	...	100,00
Frutas	93,75	6,25	94,12	5,88
Manteiga	6,25	93,75	11,76	88,24
Margarina	84,38	15,63	58,82	41,18
Banha	...	100,00	...	100,00
Óleo	96,88	3,13	100,00	...

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

1 mais freqüentes (%);

2 menos freqüentes (%).

Para o grupo de leite e derivados, o consumo diário de leite integral foi relatado pela quase totalidade das entrevistadas, média de 81,9% entre os grupos, sendo 87,5% para o grupo das amostras não ácidas e 76,47% para o grupo de amostras que apresentou acidez elevada. Dado este semelhante aos encontrados por Tudisco et al., (1985) que estudaram padrão alimentar em mães de nível sócio-econômico baixo durante a fase de lactação. Tal estudo relatou a prevalência de consumo de leite integral tipo C para mulheres nesta condição.

Quanto aos grupos de alimentos protéicos de origem animal como: ovos, carne bovina e frango, o consumo semanal prevaleceu, encontrando valores médios de 90% para o consumo semanal de frango, por exemplo.

Noventa e sete por cento do consumo de leguminosas e hortaliças estabeleceram na frequência diária e semanal somados, sendo que os itens mais citados foram feijão e alface para os grupos respectivos. O mesmo fato é possível notar em estudos desenvolvidos por Tudisco et al., (1985) no qual o feijão do grupo das leguminosas foi o único componente citado, e quanto ao grupo de hortaliças constatou-se preferência das mães no consumo de alface.

O consumo de doces e alimentos preparados fritos (fritura) tiveram uma distribuição de frequência de consumo heterogênea em relação aos dois grupos de amostras, aquelas com acidez elevada $> 8^{\circ}\text{D}$ e outra com índice de acidez aceito $\leq 8^{\circ}\text{D}$. Sendo que para fritura – no grupo de amostras de LH aprovados por acidez – o consumo diário ficou em 12,5%, enquanto o consumo semanal estabeleceu-se em 65,6%. Deste grupo, 21,88% das entrevistadas não consomem ou eventualmente consomem alimentos fritos. No outro grupo estabelecido, os valores encontrados para o consumo de frituras ficaram em 83,13% com diário e semanal somados, 5,88% para o consumo mensal, índice este encontrado também para o não consumo de alimentos fritos por mulheres lactantes.

Para doces, o grupo das amostras de leite humano rejeitados por acidez elevada, apresentou índice de consumo diário e semanal somados igual a 88,24%, valor este considerado significativo perto do índice 11,76% encontrado nas lactantes que nunca consomem doce.

O consumo acentuado de sucos entre as lactantes foi observado em ambos os grupos, ficando o índice percentual próximo a 90% no consumo diário e semanal somados. Este item tinha por objetivo avaliar o consumo de sucos naturais tipo vitaminas, porém os altos índices encontrados foram relacionados com suco artificial disponível em pó no comércio.

Conforme Tabela 7, dentre o grupo de lactantes com amostras aprovadas por acidez, é possível observar índice igual a 53,13% para o não consumo de café puro. Enquanto para o outro grupo um valor bem próximo é encontrado, 47,06%, porém para o consumo semanal desta bebida.

O não consumo de bebida alcoólica prevaleceu nos dois grupos analisados com índices de 93,75% e 94,12% entre os grupos com amostras aprovadas por acidez e rejeitadas por acidez, respectivamente.

Semelhante aos dados encontrados por Tudisco et al., (1985), para o consumo de frutas houve predomínio de banana e laranja porém o presente estudo relata índices percentuais próximos a 60% para ingestão diária enquanto no estudo comparativo esta foi considerada mínima. O baixo consumo de frutas pelas lactantes pode ser explicado por Ichisato (2001), que pesquisou sobre aleitamento materno e as crenças alimentares e verificou através de relatos de mulheres lactantes que estas acreditavam que tudo que comiam passava para o leite materno e poderiam muitas vezes fazer mal a criança. Os mais antigos ordenavam às lactantes que restringissem a ingestão de algumas frutas e isso era respeitado.

No grupo óleos e gorduras onde se contemplam: margarina, manteiga, óleos e banha o mais consumido foi a margarina, 84,38% do consumo diário e semanal do grupo de amostras aprovadas por acidez. Este valor é igual a 58,82% para a mesma frequência do grupo de amostras rejeitadas por acidez. A diferença entre os índices percentuais é 25,56%, ultrapassando o critério estabelecido (20%). Porém, este alimento em questão foi motivo de muitas incertezas por parte das entrevistadas, havendo sempre um equívoco entre a distinção de manteiga e margarina.

Pequenas diferenças são observadas em relação ao consumo de alimentos e alteração de acidez do leite humano, como pode ser comprovado pelos dados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Correlação entre dados de acidez Dornic e nutrição

Correlação de Pearson			
		Acidez Dornic (°D)	Alimentos consumidos
Acidez Dornic (°D)	Correlação	1	-0,1858
	p-valor	...	0,0345
	n	19	19
Alimentos Consumidos	Correlação	-0,1858	1
	p-valor	0,0345	...
	n	19	19

Nota: sinal convencional utilizado:

... dado não numérico não disponível

A Tabela 9 mostra os resultados do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis acidez Dornic e porcentagem de alimentos consumidos. Pode-se observar que para os valores médios de acidez, o coeficiente de correlação amostral foi de 0,185844 indicando uma baixa correlação. Também a Tabela 9 testa as hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \rho = 0 \\ H_1 : \rho \neq 0 \end{cases} . \text{ Como } p\text{-valor} > \alpha = 5\% \text{ então não rejeita-se } H_0, \text{ indicando que}$$

estatisticamente não existe uma relação linear entre as variáveis envolvida no estudo (α : nível de significância).

Para obtenção de tais dados foi utilizado uma média dos valores de acidez (valor médio = 4,5°D para as amostras aprovadas e 14,75°D para as amostras rejeitadas). E nos dados de consumo de alimentos (n=19 grupos de alimentos) foram utilizados os grupos de alimentos descritos na tabela de frequência alimentar (Tabela 7).

De acordo os valores encontrados não foi possível detectar correlação entre a nutrição da lactante e os valores de acidez encontrados nas amostras de leite humano.

Como as diferenças percentuais foram pequenas e muitas variáveis foram envolvidas, somente com a literatura não foi possível estabelecer uma correlação com a acidez. Estudos podem ser desenvolvidos para enfatizar esse dado.

Não há na literatura trabalhos científicos nesta linha de pesquisa para a comparação e discussão dos dados, o presente estudo procurou concretizar dados de uma hipótese, porém, pesquisas mais aprofundadas devem ser desenvolvidas nesta frente de pesquisa.

5 CONCLUSÕES

- Os grupos dos microrganismos mesófilos aeróbios totais e bactérias lácticas foram os isolados em 100% (72) das amostras analisadas de leite humano cru; as contagens microbianas, porém, apresentaram uma grande variação entre 1 a 10^7 UFC/mL. Bactérias lipolíticas isoladas em 31,9% das amostras, coliformes totais em 47,2%, *E. coli* em 26,38 % e *Staphylococcus* coagulase positiva em 18,06%.
- Nas amostras com valor de acidez $\leq 8^\circ\text{D}$ as populações microbianas encontradas foram: para o grupo dos microrganismos mesófilos aeróbios totais e bactérias lácticas a população máxima encontrada ficou na ordem de 10^6 UFC/mL. Para bactérias lipolíticas este valor foi igual 9×10^5 UFC/mL coliformes totais foram isolados em 34 amostras, destas, 87,5% confirmaram também a presença de *E.coli*. Para *Staphylococcus* coagulase positiva o valor máximo encontrado foi 1×10^4 UFC/mL e foi similar às amostras ácidas e não ácidas.
- Nas amostras rejeitadas as contagens máximas tanto para o grupo de mesófilos como de bactérias lácticas foram da ordem 10^7 UFC/mL. As bactérias lipolíticas foram encontradas em 54,16% do total de amostras analisadas e o grupo dos coliformes foi detectado em 52,94% das amostras ácidas, destas 33,33% apresentaram crescimento de *E. coli*.
- Com a metodologia utilizada e com as amostras de leite humano do BLH em questão não foi possível a correlação entre as variáveis: população de mesófilos totais e acidez..
- Para os dados de consumo de alimentos apresentados também não foi possível estabelecer correlação com a acidez Dornic das amostras analisadas..
- Com os dados obtidos neste estudo, aparentemente, a titulação Dornic não é um método eficaz para avaliar indiretamente o crescimento microbiano no leite humano ordenhado.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. Rancidity in foods. In: _____. **Rancidy in foods**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. chap. 10, p.180-190.

ALMEIDA, J. A. G. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.80, p. 119-125, 2004.

ASSIS NETO, A. C. A., PEREIRA, M. M. G., PEREIRA, T. G., SANTOS, M. C. M., Perfil Microbiológico do Leite Materno do Banco da Maternidade Evangelina Rosa – Teresina (Piauí). **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n.1, p. 75-84, 2001.

AKRÉ, J. (Ed.). **Alimentacion infantil**: bases fisiologicas. Guatemala: Organización Mundial da Saúde, 1990. 121 p.

BENKOV, K., LeLEIKO, N. S. A rational approach to infant formulas. **Pediatric Annals**, Elk Grove Village, v.16, p.225-230, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Naciona de Defesa Agropecuária Laboratório de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria 171 de 04 de dezembro de 2006**. Estabelece: O Banco de Leite Humano dentro da regulamentação técnica é o responsável pela promoção, execução, processamento e controle do colostro, leite de transição e leite maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou de nutricionista. Brasília, 2006.

_____. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 4. ed. Brasília, 2001.

_____. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição; Secretaria de Programas Especiais. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno. **Normas gerais para banco de leite humano**. Brasília, 1998a.

_____. Secretaria de Política de Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de banco de leite humano**. 3. ed. Brasília, 1998b.

_____. Secretaria de Políticas Sociais. **Normas gerais para bancos de leite humano**. Brasília, 1998c.

BORTOLOZO, E. A. F. Q.; PIETROSKI, G.; BAGGIO, R.; CANDIDO, L. M. B., Padrão microbiológico e sanitário do leite humano, processado em banco de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n.122, p. 85-8, 2004.

CANOTILHO, A. **A amamentação no peito. Como e porquê amamentar. Doenças transmissíveis**. Lisboa: Terra Vista. Disponível em: <<http://www.terravista.pt/Portosanto/2131/pagina88.htm>>. Acesso: 17 jan. 2003.

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

CAVALCANTE, J. L. P.; TELLES, F. J. S.; PEIXOTO, M. M. L. V.; RODRIGUES, R.C.B., Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, 1-12, jan./mar. 2005.

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

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. 2.ed. Viçosa: Suprema, 2000. 488p.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Normas técnicas Rede BLH-Br para bancos de leite humano**. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/doadora.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu. 1996. 182p.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of Microorganisms. In: Marshall, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 2005. chap 8, p. 276-279.

GALO, C.R., **Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade**, 1978. 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1978.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. , Acid-Producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap. 19, p.201-208.

HAMBRAEUS, L. Leche humana: aspectos nutricionales. In: **Nutrición clínica em la infancia**. New York:Verrey/Raven Press, 1990. p. 289-301.

HASS, M.J., Lipolytic Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap. 15, p.175-181.

HECK, A. R.; Controle de qualidade: da coleta à distribuição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCO DE LEITE HUMANO, 1., Ribeirão Preto, 2002. **Resumos....** Disponível em: www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm. Acesso em: 20 set. 2007.

HECK, A. R.; FERREIRA, E. M. Qualidade físico-química do leite humano. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BANCO DE LEITE HUMANO, 1., Natal, 2000. **Resumos...** Disponível em: www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm. Acesso em: 23 set. 2007.

HEINE W. Is mother's milk the most suitable food very low birth weight infants? **Early Human Development**, Limerick, v.29, p. 345-350, 1992.

ICHISATO, S. M. T., SHIMO, A. K. K., Aleitamento materno e as crenças alimentares. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, São Paulo, v.9, n.5, p.70-76, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza : Acribia, 1992. 804p.

KORNALKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap.. 8, p. 69-80.

LANCETE, G. A.; BENNETT, R. W., *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap.. 39, p. 387-400.

LIN, F. J., BARNHART, H. M., BAILEY, J. S., COX, N. A., EITENMILLER R. R., Bacteriological Profiles of Human Milk from Individual Donors and Pooled Samples from a Commercial Milk Bank, **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, p. 467-70, 1988.

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

LUCAS, A.; GIBBS, J. A. H.; LYSTER, R. L. J.; BAUM, J. D., Crematocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. **British Medical Journal**, London, v.1, p.1018–1020, 1978.

MACKIE, R. I., SGHIR, A., GASKINS, H. R., Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.5, p.1035S-1045S, 1999.

MORTIMORE, S., WALLACE, C. **HACCP: enfoque prático**. Zaragoza: Acríbia, 1995. 291p.

MORTON, R. D., Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap.. 7, p. 63-67.

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

NOVAK, F.R., ALMEIDA, J.A.G., SILVA., R.S. Casca de banana: uma possível fonte de infecção no tratamento de fissuras manilares. **Jornal da Pediatria**, Rio de Janeiro, v.79, n.3, p. 221-226, 2003.

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

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**, São Paulo, v. 17, n.107, p. 43-8, 2003.

REBELO, P. **Qualidade em saúde**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1996. 179p.

REGO, J. D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 47–82.

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

SCARSO, I. S. **Controle de qualidade em banco de leite humano**. 2003. 110p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Saúde) - Faculdade de Tecnologia de Sorocaba, Sorocaba, 2003.

SILVA, V. G.; ALMEIDA, J. A. G. Crescimento bacteriano em leite humano ordenhado. In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE, 1., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Disponível em: www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm. Acesso em: 07 ago 2007a.

_____. Curva de crescimento bacteriano em leite humano ordenhado X acidez Dornic. In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE, 1., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Disponível em: www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm. Acesso em: 07 ago 2007b.

SOARES, N. T.; GUIMARÃES, A. R. P.; SAMPAIO, H. A. C.; ALMEIDA, P. C.; COELHO, R. R. Padrão alimentar de lactentes residentes em áreas periféricas de Fortaleza. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.3, p.167-176, 2000.

TUDISCO, E. S.; MANOEL, N. J.; GOLDENBERG, P.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F.; SIGULEM, D. M.; Comparação do padrão alimentar de mães de baixo nível sócio-econômico durante a fase de lactação e após desmame. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.19, 1985. p. 133-45.

WEST, P. A.; HEWITT, J. H.; MUPHY, O. M. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.46, n.2, p.269-277, 1979.

WILSON, E. D.; FISHER, K. H.; FUQUA, M. E. **Principles of nutrition**. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 1975. 747p.

APÊNDICE I

Banco de Leite Humano do Conjunto Hospitalar de Sorocaba

O Banco de Leite Humano funciona nas dependências do Conjunto Hospitalar de Sorocaba e trata-se de uma sociedade civil com licença para executar serviços de captação, guarda, armazenamento e distribuição do leite materno. O objetivo principal é promover, apoiar e incentivar o aleitamento materno. É uma entidade sem fins lucrativos, sendo vetada a comercialização do produto por ele distribuído.

O Banco de Leite destina seu produto para atendimentos externos (outras entidades) e abastecimento interno (berçário, UTI neonatal e pediatria).

O Banco de Leite do Conjunto Hospitalar de Sorocaba funciona de acordo com os padrões estabelecidos pela Fundação Oswaldo Cruz que é considerada referência nacional. Suas instalações físicas e capacitação de funcionários são realizadas em função do Banco de Leite de Ribeirão Preto pois é o de referência no Estado de São Paulo.

As doadoras interessadas em colaborar com o BLH demonstram interesse por meio telefônico ou contato pessoal diretamente com as funcionárias do Banco. Essas, devem suprir as necessidades alimentares dos próprios bebês e somente o excesso deve ser doado.

Depois do primeiro contato, um funcionário se dirige à casa da nutriz e aplica questionário que deve ser respondido pela própria doadora para registro no banco de dados do BLH. As orientações sobre os cuidados a serem tomados na hora das ordenhas, também são realizados, já com distribuição dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e frascos estéreis para início das coletas.

Como principais orientações para coleta com assepsia são: lavagem de mãos e mama com sabonete asséptico antes do início da ordenha; uso de máscara e touca durante a ordenha; manter o leite ordenhado congelado em *freezer* ou congelador nos frascos de vidro estéreis distribuídos pelo BLH.

As doadoras são submetidas a exames sorológicos obrigatórios como: tuberculose, hepatite B, mastite, malária, herpes simples, varicela e AIDS. Depois dos

resultados constatados negativos para todos os parâmetros ela é considerada uma doadora oficial do BLH.

A maior parte das doações de leite recebidas no Banco de Leite de Sorocaba são feitas através das coletas domiciliares no qual a lactante é orientada a fazer a ordenha com assepsia e manter o leite congelado na sua casa até a chegada de um funcionário do BLH.

As visitas dos funcionários do BLH para retirada do leite na casa da doadora é agendada, realizada geralmente uma vez por semana de acordo com a posição geográfica do bairro que mora.

O leite ordenhado cru fica armazenado no período máximo de 15 dias antes de ser pasteurizado. Após o tratamento térmico o produto tem validade de 6 meses, armazenado congelado.

APÊNDICE II

Descrição das atividades rotineiramente desenvolvidas no BLH-CHS.

As coletas são realizadas semanalmente por uma equipe de funcionários do BLH. Os frascos de vidro estéreis com volume de 250mL ou 500mL, anteriormente distribuídos, são recolhidos. Há uma inspeção visual realizada pelo próprio funcionário que verifica se a amostra encontra-se congelada completamente, se não existe indícios de sujidades físicas como: cabelo, pelo, etc; se o frasco encontra-se intacto, sem quebra ou trincas; se a identificação com número da doadora e data da primeira ordenha encontram-se descritas.

As amostras são transportadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável até o *freezer* de acondicionamento de amostras que aguardam pasteurização no Banco de Leite.

O processo de tratamento térmico se inicia com a retirada das amostras do *freezer* e encaminhamento das mesmas para o banho-maria a 45°C onde o processo de descongelamento do LH ordenhado é realizado. São necessários 20 minutos, em média.

Alíquotas de 10mL das amostras liqüefeitas são retiradas com uso de seringa estéril e descartável e transferidas para tubos de ensaios previamente esterilizados. Essas alíquotas são imediatamente encaminhadas para o Setor de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz (IAL) onde são realizadas as análises de acidez e crematócrito.

O maior volume das amostras coletadas, restante no frasco, seguem para o processo de pasteurização. Elas são reenvasadas em frascos estéreis com volumes equivalentes e colocadas em galheteiros (suporte) que ficarão imersos em água no banho-maria. O nível da água deve ser superior ao do produto no interior dos frascos. É recomendado colocar um frasco controle que contém o mesmo volume de leite do restante do lote e possui acoplado um termômetro para controle da temperatura do produto durante o processo de tratamento térmico.

Ao observar a temperatura de 62,5°C no *display* do equipamento e na escala graduada do termômetro do frasco controle é marcado imediatamente 30 minutos e se inicia o processo de pasteurização. Tempo inferior a 30 minutos torna a pasteurização ineficaz. Tempo superior implicará na perda do valor biológico do produto.

Uma planilha controle é utilizada para acompanhar o processo de pasteurização; anotações de temperatura do equipamento e do frasco controle são realizadas em intervalos de 5 minutos.

Transcorrido o tempo de tratamento térmico, os frascos são retirados e imediatamente transferidos ao processo de resfriamento. O resfriamento é conduzido por imersão dos frascos, nos galheteiros, em água a $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Essa temperatura é atingida por uma mistura de água e gelo.

Na planilha é anotada a temperatura do equipamento, observada no *display*, e do frasco controle. A temperatura de 7°C deve ser atingida em 15 minutos.

Os frascos são retirados do resfriador, enxutos com pano estéril e mantidos em caixas isotérmicas revestidas com gelo reciclável até a retirada da alíquota para o controle microbiológico.

As alíquotas de 10mL de leite são retiradas de cada frasco. Seringas e agulhas descartáveis, tubos de ensaio estéreis e ambiente estéril (campo de chama) são utilizados para retirada asséptica das alíquotas. Os tubos de ensaio devidamente identificados com número da doadora e número da amostra são armazenados congelados para no dia seguinte serem encaminhados para o Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba para realização da análise microbiológica de controle do processo de tratamento térmico.

Os frascos de leite materno pasteurizados são armazenados em *freezer* específico para amostras que aguardam liberação. Esta, chega por escrito através dos laudos emitidos pelo IAL tanto das análises físico-químicas como microbiológicas.

As amostras aprovadas para ambas análises são encaminhadas para o lactário onde são fracionadas e as rejeitadas são descartadas.

As análises de controle (físico-químicas e microbiológicas) são realizadas no Instituto Adolfo Lutz devido a proximidade física do laboratório com o Banco de Leite em questão e pela presença de profissionais capacitados para execução das análises.

No período do estudo o Banco de Leite de Sorocaba mantinha um estoque de leite baixo podendo atender somente os recém-nascidos prematuros da Unidade de Terapia Intensiva.

As lactantes que recebem alta médica mas os seus filhos tem que permanecer na unidade hospitalar, são orientadas a fazer a coleta diária no próprio banco de leite e os seus filhos recebem leite exclusivo da mãe.

ANEXO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Cara voluntária, você está sendo convidada a participar da pesquisa “Relação dos Parâmetros Microbiológicos e Nutricionais com o Índice de Acidez Elevado em Leite Humano Recebido em Bancos de Leite”, projeto de dissertação de Mestrado do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da aluna Isis Sabrina Scarso, cujo orientador é o Prof. Dr. Ernani Porto. Leia atentamente este termo para decidir se deseja participar do mesmo ou não.

Amostras de leite doadas consideradas muito “ácidas” podem ser descartadas nos bancos de leite. Como o número de doações já é insuficiente para atender as pessoas que necessitam, o entendimento das razões desta “acidez” poderia evitar estas perdas. Portanto, este trabalho pretende verificar os fatores que podem influenciar na acidez do leite humano ordenhado. Para tal, você deverá responder a um questionário sobre hábitos alimentares que será realizado de forma direta e individual pela própria aluna a cada lactante. Uma pequena porção do leite coletado será separada e analisada para determinar a acidez e a presença de bactérias. A coleta do leite será realizada pelos funcionários do Banco de Leite Humano do Conjunto Hospitalar de Sorocaba, como feito rotineiramente e o questionário será aplicado nesta mesma sessão. As amostras de leite serão analisadas nos laboratórios da ESALQ-USP de Piracicaba-SP. Não grupo placebo neste estudo, assim como não formas alternativas de obtenção da informação desejada nesta pesquisa. O projeto foi avaliado e aprovado pela Diretoria Técnica do Serviço de Banco de Leite Humano, que supervisionará a execução do mesmo. Caso você não aceite ou desista de participar deste estudo em qualquer de suas fases, você pode fazê-lo sem qualquer prejuízo ou punição. Seus dados individuais, assim como sua identidade não serão divulgados, sendo garantido o seu sigilo. Você não terá qualquer despesa por participar desta pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento. Você não receberá pagamento ou benefício direto pela participação, mas se alguma alteração for detectada na sua amostra de leite, você será informada. Caso se confirme que algum alimento ou modo de preparar alimento cause a acidez do leite, você será informada a respeito. A participação na pesquisa não causará qualquer risco ou desconforto previsível e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste termo. Você será esclarecida quanto a todos os detalhes referentes a esta pesquisa. Em caso de dúvida ou qualquer problema relacionado à pesquisa, entre em contato com a aluna Isis Sabrina Scarso, no celular (15) 91056921 ou com seu orientador na ESALQ, o Prof. Dr. Ernani Porto no telefone (19) 3429 4131 ou no endereço Av.: Pádua Dias, 11 - Caixa Postal 9 – CEP 13418 900 - Piracicaba SP. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa, entre em contato com o comitê de ética: CEP-FOP, Av. Limeira, 901, Piracicaba – SP. CEP 13414-903, Tel/Fax (0xx19) 2106-5349 e-mail: cep@fop.unicamp.br Website: www.fop.unicamp.br/cep

Ao assinar abaixo, declaro que todo o procedimento do estudo me foi explicado em detalhes e que não restam dúvidas quanto ao conteúdo deste termo:

Eu (nome e assinatura), _____, RG _____,

Testemunha: _____ Assinatura: _____