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

**Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido
em Banco de Leite Humano**

Maria Rita de Cássia Contin Castro

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

Piracicaba

2006

Maria Rita de Cássia Contin Castro
Nutricionista

**Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido
em Banco de Leite Humano**

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

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

Piracicaba
2006

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

Castro, Maria Rita de Cássia Contin

Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em Banco de Leite Humano / Maria Rita de Cássia Contin Castro. - - Piracicaba, 2006.
61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Análise de alimentos 2. Bancos de leite 3. Conservação de alimentos pelo frio
4. Leite – Humano 5. Microbiologia de alimentos I. Título

CDD 612.644

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mães doadoras do banco de leite humano do Hospital “Santa Casa de Misericórdia” de Limeira/SP; ao meu esposo Francisco Carlos e aos meus filhos Manuela, Francisco e Guilherme que sem cobranças ou exigências caminham ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- a Deus, por sua Graça;
- ao Professor Dr. Ernani Porto, pela sua paciência e orientação;
- à Profa. Dra. Solange Guidolin Canniati Brazaca, pela sua atenção;
- à Dra. Soraya Drago Menconi, pela sua eterna amizade;
- às colaboradoras do Projeto: Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin,
Juliana Aparecida Battistella Berti,
Ligia Dozena Domingos,
Vanessa Cristina Nogueira;
- ao Padre Alquermes Valvassori e ao Comitê de Ética da “Santa Casa de Misericórdia” de Limeira/SP;
- às Técnicas do banco de leite da “Santa Casa de Misericórdia” de Limeira/SP;
- ao Centro Estadual de “Educação Tecnológica” “Paula Souza”, através da ETE “Trajano Camargo” de Limeira, que permitiu a execução deste projeto;
- aos meus pais Antonio e Maria Isabel;
- às amigas Maria Tereza Trovó de Almeida, Jacqueline D. Páteo Curi e Íris Borges de Almeida, pela amizade e incentivo; e
- aos funcionários da biblioteca TEC, Beatriz, Raquel e Midiam, pelo trabalho e atenção.

“Tecendo a manhã

*Um galo sozinho não tece uma manhã;
ele precisará sempre de outros galos:
de um que apanhe o grito que um galo antes
deu e o lance a outros; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.”*

João Cabral de Melo Neto

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Valores nutricionais do leite humano.....	15
2.2 Proteínas.....	17
2.3 Imunoglobulinas.....	17
2.4 Gorduras.....	18
2.5 Vitaminas e sais minerais.....	19
2.6 Carboidratos.....	20
2.7 Efeito bifidogênico.....	20
2.8 Microbiologia do Leite Humano.....	20
2.9 Banco de Leite Humano.....	25
2.9.1 A acidez titulável do leite humano.....	27
2.9.2 Pasteurização.....	29
2.9.3 Refrigeração após pasteurização.....	29
2.9.4 Congelamento após pasteurização.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Descrição do BLH da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Limeira.....	31
3.2 Amostragem.....	31
3.3 Caracterização microbiológica do leite coletado.....	32
3.3.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (+).....	32
3.3.2 Contagem global de microrganismos aeróbios totais.....	34
3.3.3 Contagem de microrganismos do grupo coliforme total e <i>Escherichia coli</i>	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÕES.....	50

REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICES.....	59

RESUMO

Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em banco de leite humano

Este estudo visou analisar a qualidade microbiológica do leite humano cru recebido em um banco de leite humano (BLH), quantificando os microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positivos (ECP), coliformes totais e *Escherichia coli*.

Foram realizadas análises microbiológicas em 60 amostras de leite humano cru recebidas no BLH e os resultados foram os seguintes: o microrganismo *E. coli* foi positivo em 50% das amostras analisadas, os coliformes totais em 75% delas, o ECP em 46,66% e em 96,66% do total das amostras foram detectados microrganismos aeróbios mesófilos.

Das amostras analisadas, a população de *E. coli* foi positiva em 93,33% (28 amostras) com uma variação entre 1 e 99 NMP/mL; 3,33% (1 amostra) entre 10^4 e $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; 3,33% (1 amostra) entre 10^5 e $9,9 \times 10^5$ NMP/mL.

A população de coliformes totais que foi positiva em 57,77% (26 amostras) das amostras analisadas ficou entre 1 e 99 NMP/mL; 24,4% (11 amostras) ficaram entre 10^2 e $9,9 \times 10^2$ NMP/mL; 2,22% (1 amostra) entre 10^3 e $9,9 \times 10^3$ NMP/mL; 8,88% (4 amostras) entre 10^4 e $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; 4,44% (2 amostras) entre 10^5 e $9,9 \times 10^5$ NMP/mL; 2,22% (1 amostra) entre 10^6 e $9,9 \times 10^6$ NMP/mL.

Os microrganismos aeróbios mesófilos apresentaram-se na quase totalidade das amostras, sendo que 17,24% (10 amostras) variaram de 1 a 99 UFC/mL; 17,24% (10 amostras) entre 10^2 e $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,34% (6 amostras) ficaram entre 10^3 e $9,9 \times 10^3$ UFC/mL; 25,86% (15 amostras) entre 10^4 e $9,9 \times 10^4$ UFC/mL; 17,24% (10 amostras) entre 10^5 e $9,9 \times 10^5$ UFC/mL; 10,34% (6 amostras) entre 10^6 e $9,9 \times 10^6$ UFC/mL e 1,72% (1 amostra) entre 10^7 e $9,9 \times 10^7$ UFC/mL. Porém, 3,33% (2 amostras) apresentaram-se negativas.

Do total de amostras analisadas, o grupo dos microrganismos ECP apresentou-se em 78,57% (22 amostras) com variação entre 1 e 99 UFC/mL; em 3,57% (1 amostra) entre 10^2 e $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,71% (3 amostras) entre 10^3 e $9,9 \times 10^3$ UFC/mL e 7,14% (2 amostras) entre 10^4 e $9,9 \times 10^4$ UFC/mL.

Palavras chaves: Leite humano; Banco de leite humano; Microrganismos indicadores.

ABSTRACT

Evaluation of the microbiological quality of raw human milk received in the human milk bank

This paper aimed to analyze the microbiological quality of the raw human milk which is received in a human milk bank (HMB) by quantifying the aerobic mesophiles, *Staphylococcus aureus* (SCP), total coliforms and *Escherichia coli*.

Sixty (60) samples of raw human milk received in HMB were microbiologic analyzed and the results were as follows: the *E. coli* microorganism was positive in 50% of the analyzed samples, the total coliforms were in 75% of them, the ECP in 46,6% and in 96,6% of the total amount of samples aerobic mesophiles microorganisms were detected.

From the total analyzed samples, the population of *E. coli* was positive in 93,33% (28 samples) with a variation between 1 and 99 NMP/mL; 3,33% (1 sample) was between 10^4 and $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; 3,33% (1 sample) was from 10^5 to $9,9 \times 10^5$ NMP/mL.

The population of the total coliforms which was positive in 57,77% (26 samples) of the total analyzed samples were between 1 and 99 NMP/mL; 24,4% (11 samples) were between 10^2 and $9,9 \times 10^2$ NMP/mL; 2,22% (1 sample) were between 10^3 and $9,9 \times 10^3$ NMP/mL; 8,88% (4 samples) were between 10^4 and $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; 4,44% (2 samples) between 10^5 and $9,9 \times 10^5$ NMP/mL and in 2,22% (1 sample) from 10^6 to $9,9 \times 10^6$ NMP/mL.

The aerobic mesophiles microorganisms were presented in almost all the samples, being: 17,24% (10 samples) with a variation of 1 to 99 UFC/mL; 17,24% (10 samples) between 10^2 and $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,34% (6 samples) were between 10^3 and $9,9 \times 10^3$ UFC/mL; 25,86% (15 samples) between 10^4 and $9,9 \times 10^4$ UFC/mL; 17,24% (10 samples) between 10^5 and $9,9 \times 10^5$ UFC/mL; 10,34% (6 samples) between 10^6 and $9,9 \times 10^6$ UFC/mL and in 1,72% (1 sample) between 10^7 and $9,9 \times 10^7$ UFC/mL. However 3,33% (2 samples) showed to be negative.

From the total analyzed samples, the SCP group presented in 78,57% (22 samples) with a variation between 1 and 99 UFC/mL; 3,57% (1 sample) between 10^2 and $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,71% (3 samples) between 10^3 e $9,9 \times 10^3$ UFC/mL and 7,14% (2 samples) were between 10^4 and $9,9 \times 10^4$ UFC/mL.

Keywords: Human milk; Milk bank; Indicator microorganisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plaqueamento em meio B.P. e teste de coagulase.....	33
Figura 2 -	Plaqueamento em meio P.C.A.....	35
Figura 3 -	Determinação de coliformes em meio LST-MUG.....	36
Figura 4 -	Determinação de <i>E. coli</i> em câmara de fluorescência.....	37
Figura 5 -	Distribuição das populações de microrganismos <i>E. coli</i> nas amostras positivas (NMP/mL).....	40
Figura 6 -	Distribuição das populações de coliformes totais nas amostras positivas (NMP/mL).....	43
Figura 7 -	Distribuição das populações de microrganismos aeróbios mesófilos positivos encontrados nas amostras (UFC/mL).....	45
Figura 8 -	Distribuição das populações de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo encontrados nas amostras (UFC/mL).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do leite humano.....	16
Tabela 2 - Contagens microbiológicas no leite humano cru.....	38
Tabela 3 - Distribuição da frequência da população de microrganismos nas amostras de leite humano analisadas.....	40

1 INTRODUÇÃO

O leite materno é o alimento mais adequado ao recém-nascido devido seu valor nutricional e fisiológico. Possui propriedades imunológicas para proteção do trato gastrointestinal e sistema respiratório da criança. O fato de muitas vezes a criança estar impossibilitada de receber o leite materno pelo aleitamento natural, motivou a criação dos bancos de leite humano para suprir essa necessidade (GIUGLIANI, 2002).

Contudo, quando o leite humano (LH) é manipulado, como ocorre nos BLHs (bancos de leite humano), há exigências do emprego de tecnologias adequadas, devido aos microrganismos presentes ao ambiente comum à mãe, à criança e a utensílios usados para armazenar o leite humano.

Os BHLs (bancos de leite humano) utilizam o emprego de tecnologias de conservação para conferir segurança ao leite materno: o uso de tratamentos térmicos (pasteurização) para reduzir a carga microbiana e eliminar possíveis microrganismos nocivos à saúde; a refrigeração e o congelamento, visando à estocagem e transporte do produto.

Atualmente, os BLHs, como práticas de beneficiamento, utilizam a pasteurização do leite humano a 62,5°C por trinta minutos.

A partir de 1985, por meio de uma ação conjunta realizada pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - e o Programa Nacional de Aleitamento Materno, PNAM, teve início o desenvolvimento de um subprograma, com vistas a promover uma expansão qualitativa e quantitativa dos bancos de leite humano no Brasil que já conta com uma rede de 172 BLHs (BORGO et al. 2005; REGO, 2002). (APÊNDICE A). Contudo o leite humano constitui um excelente meio de cultura que permite a multiplicação de um grande número de espécies de microrganismos. A manutenção da qualidade do leite pasteurizado depende de muitos fatores, desde a ordenha até o consumo, incluindo qualidade bacteriológica do leite cru, condições de pasteurização e condições higiênico-sanitárias (COSTA; SOUZA; SANTOS, 2004).

A Resolução nº12 (BRASIL, 2001) cita para o leite humano pasteurizado de bancos de leite, os seguintes padrões microbiológicos: microrganismos aeróbios mesófilos viáveis/mL em 10^2 , ausência de coliformes a 35°C/mL, ausência de *Staphylococcus* coagulase positivo/mL, ausência de *Salmonella* sp/25 mL.

Como rotina nos BLHs (bancos de leite humano) há necessidade de selecionar o leite humano cru antes de ser pasteurizado, o que é realizado pela análise da acidez titulável em Graus Dornic, de acordo com a RNBLH (Rede Nacional de bancos de leite humano). A acidez normal do leite humano deve estar entre 1,0 a 8,0 graus Dornic para ser pasteurizado (BRASIL, 2006).

Após a pasteurização do leite recebido, análises de presença ou ausência de microrganismos do grupo coliformes são realizadas para determinar a aceitação ou rejeição do leite recebido.

O leite materno processado em bancos de leite atende principalmente bebês prematuros ou doentes, que não conseguem mamar diretamente na mãe. O incentivo à amamentação é uma das estratégias para a redução da mortalidade neonatal. Isso é devido aos benefícios do aleitamento. As principais causas da mortalidade neonatais têm como motivos, problemas respiratórios e o baixo peso (SALVIANO; CAVALCANTE, 2004).

Seguindo um artigo fundamental da Declaração de Genebra, segundo o qual toda criança tem direito ao aleitamento materno, e outro, da Declaração de Direitos Humanos que estabelece que mãe e filho têm direito a cuidados e assistência especial, os bancos de leite têm revelado a sua grande missão (UNICEF, 1998). São verdadeiros centros de proteção, promoção e manutenção da prática do aleitamento materno, mesmo quando seja ela intermediada pelo beneficiamento do leite humano, como ocorre em bancos de leite humano (ASSIS; SANTOS; SILVA, 1983). O incentivo à amamentação é uma das estratégias para redução da mortalidade neonatal.

Este estudo analisou os padrões microbiológicos de leite humano cru, maduro, recebido em bancos de leite. Os microrganismos que foram isolados são indicadores das condições higiênico-sanitárias do produto. Atualmente os bancos de leite não realizam análises microbiológicas quantitativas devido ao alto custo, e porque

necessitam de métodos rápidos na determinação da qualidade do leite humano recebido.

Os resultados obtidos deste estudo são decorrentes da manipulação e armazenamento sob congelamento do leite humano em domicílio pelas doadoras.

Através deste estudo procurou-se contribuir com esse grande trabalho realizado pelos bancos de leite pela utilização do leite materno, o qual possui propriedades nutricionais e imunológicas adequadas à recuperação dos recém-nascidos que dele necessitam.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos bancos de leite humano, os processos de coleta, doação, triagem, pasteurização, estocagem e conversão em forma de consumo envolvem procedimentos com riscos de contaminação (BRITTO; BARBOSA; MERCHAN-HAMANN, 2002).

O Centro de Referência Nacional da FioCruz desenvolveu seguras metodologias de controle de qualidade, para serem praticadas na rotina dos bancos de leite humano. Enquanto em várias regiões do mundo, os bancos de leite foram fechados, por segurança operacional e risco biológico, o Brasil viveu franco processo de expansão (REGO, 2002). A Rede Nacional de bancos de leite humano é uma iniciativa do Ministério da Saúde e da Fundação Oswaldo Cruz, cuja missão é promover a saúde da mulher e da criança mediante a integração e a construção de parcerias com órgãos federais, estaduais, os municipais, iniciativa privada e sociedade.

O programa inclui o processamento e controle de qualidade do leite humano. O Brasil é reconhecido pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como o país que tem a maior rede de bancos de leite da América Latina e Caribe. É também o que mais avançou em estudos científicos sobre o leite humano (TULLY, 2001). Todos os bancos de leite do Brasil são capacitados pelo Ministério da Saúde. Existem 172 no país, em todos Estados (BRASIL, 1988).

2.1 Valores nutricionais do leite humano

O leite humano é definido como o fluido biológico, destinado a alimentação do lactente, composto por todos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e que contém agentes protetores de infecções (AKRÉ, 1990). A composição química do leite humano corresponde perfeitamente às necessidades nutricionais e atende às peculiaridades fisiológicas do recém-nascido (RODRIGUES et al., 2004).

O leite humano é ideal para o recém-nascido devido ao seu conteúdo nutricional e imunológico. A composição do leite varia entre mulheres individuais e grupos étnicos e também entre amostras obtidas em um mesmo período de lactação (GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002) – Tabela 1.

Dentre os macronutrientes, a gordura é o mais variável e a lactose o mais estável. O conteúdo de vitaminas varia de acordo com a dieta da mãe.

Tabela 1 – Composição do Leite Humano

Leite Humano	Composição / Litro
Energia	580 cal.
Lactose	72 g
Proteína total	10,5 g
Lipídios	39 g
Vitamina A	670 µg
Vitamina D	0,55 µg
Vitamina E	2,3 mg
Vitamina K	2,1 µg
Tiamina	0,2 µg
Riboflavina	0,35 mg
Niacina	1,5 mg
Ácido fólico	85 µg
Ferro	0,3 mg
Vitamina B ₆	93 µg
Ácido ascórbico	40 mg
Cálcio	280 mg
Fósforo	140 mg

Fonte: Euclides, 2000.

2.2 Proteínas

O conteúdo protéico do leite materno é de apenas 1,15g/100mL, calculado a partir do nitrogênio total (fator 6,25), o que equivale a menos que 1/3 da proteína encontrada no leite de vaca (AKRÉ, 1990).

O leite adequado para a alimentação é homólogo, ou seja, produzido pela espécie em atenção às necessidades imunológicas, fisiológicas e nutricionais do recém-nascido e do lactente. A caseína humana impede a aderência da *Helicobacter pylori* às células da mucosa intestinal (REGO, 2002).

Esse baixo teor protéico é relevante, considerando-se a imaturidade do organismo do recém-nascido. A elevada quantidade de proteína encontrada no leite de vaca pode levar a distúrbios metabólicos, principalmente hepático e renal no recém-nascido. Qualitativamente, também, as proteínas diferem muito, visto que no leite de vaca predominam as caseínas e no leite humano as proteínas do soro, como a lactoalbumina (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Leve-se em consideração que os lactentes recebem os nutrientes específicos para a espécie humana. Os aminoácidos taurina e cistina, essenciais para prematuros estão presentes em maior concentração no leite humano (REGO, 2002).

Os aminoácidos livres são encontrados em quantidades significativas no leite humano. A taurina e a glutamina são encontradas em concentrações elevadas. A taurina transporta o zinco e é encontrada em grande quantidade no tecido cerebral, parecendo atuar como neurotransmissor excitatório cerebral (AKRÉ, 1990).

2.3 Imunoglobulinas

O complexo imune presente no leite humano é formado por substâncias: antimicrobianos, antiinflamatórios e imunomoduladores. Os componentes de defesa principais são as S-IgA, lactoferrina, lisozima, complexo C3, mucinas, oligossacarídeos,

e alguns lipídeos, e cada um deles apresenta características diferentes (SCHANLER, 1989).

O colostro humano, que é a primeira secreção da glândula mamária, é rico em imunoglobulinas, apesar da concentração no leite decrescer significativamente após os primeiros dias de lactação (LÖNNERDAL, 1985).

A lactoferrina, uma glicoproteína insaturada, cuja fração no leite humano corresponde a 26%, praticamente não é encontrada no leite de vaca. Cada molécula de lactoferrina transporta 2 íons de ferro, com concomitante incorporação de íons de bicarbonato. Ela é capaz de transportar cerca de 20% a 30% do ferro encontrado no leite humano, sendo mais estável; resiste à degradação de tripsina e apresenta função bacteriostática por inibir o crescimento de coliformes ao retirar do seu meio o ferro necessário para suas funções vitais (SCHANLER, 1989).

A principal imunoglobulina contida no leite humano e que representa 90% do total de IgA é a S-IgA (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001). Ela é produzida pelos linfócitos beta no intestino delgado, trato respiratório, glândulas salivar, glândula lacrimal e glândula mamária, exercendo papel de defesa contra diversos antígenos (VINAGRE, 2002).

Algumas evidências sugerem que a presença de imunoglobulinas moduladoras no leite materno, nos primeiros dias de lactação, favoreceria a diminuição do risco de certas doenças, como diabetes melitus tipo 1, linfomas, doenças de Crohn, e outras de causas imunológicas, tendo também papel importante na nutrição trófica do prematuro no período pré-natal (VINAGRE, 2002).

2.4 Gorduras

A gordura do leite humano é secretada em glóbulos microscópicos, menores que os glóbulos de gordura do leite de vaca. Os triglicérides predominam perfazendo 98% dos lipídeos dos glóbulos. As membranas globulares são compostas por fosfolipídios, esteróis (colesterol) e proteínas. A composição de ácidos graxos é relativamente

estável: cerca de 42% de ácidos graxos saturados e 57% de ácidos graxos insaturados (GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002). Apesar da concentração de ácido linoleico e outras gorduras poliinsaturadas ser influenciada pela dieta e composição dos lipídeos corpóreos da mãe, o leite materno é rico em ácidos graxos insaturados de cadeia longa, importante para o desenvolvimento e mielinização do cérebro (GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002). O leite humano proporciona de 35% a 50% da ingestão energética diária em forma de gorduras (GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002).

Sua concentração pode se alterar com o tempo da gestação, período de lactação, durante o dia, e de pessoa para pessoa. Além disso, sua qualidade varia conforme a alimentação materna (ANDERSON et al., 1988).

A presença de lipase é importante para a absorção de gordura. Ela não é inativada pelo pH baixo do estômago, mas sim pelo calor. É ativa com baixas concentrações de sais biliares, o que permite atuar no intestino dos neonatos, inclusive prematuros (AKRÉ, 1990).

2.5 Vitaminas e sais minerais

O cálcio é absorvido mais eficientemente devido à alta relação cálcio: fósforo no leite do leite humano (2:1). A alta disponibilidade do ferro no leite humano resulta de interações complexas entre os componentes do leite materno e o organismo do bebê. A maior acidez do trato gastrointestinal, a presença de quantidades adequadas de zinco, cobre e lactoferrina – fatores de transferência que impedem a disponibilidade do ferro às bactérias intestinais, são fatores importantes para aumentar a absorção de ferro. Quase 70% do ferro do leite materno é absorvido, contra 30% do leite de vaca e 10% dos substitutos do leite materno. Para compensar a baixa disponibilidade, 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 e imunidade celulares. As quantidades de zinco no leite humano são pequenas. Sua disponibilidade é alta, se comparada aos substitutos

do leite materno. O leite humano apresenta alta biodisponibilidade de ferro (SILVA et al., 2002).

2.6 Carboidratos

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, no qual também estão presentes pequenas quantidades de galactose, frutose e outros oligoelementos (PASCHOA, 1997). Esse carboidrato facilita a absorção de cálcio e ferro e promove a colonização intestinal com *Bifidobacterium bifidus*, que são bactérias lácticas. A ação destas bactérias é promover o meio ácido no trato gastrointestinal e inibir o crescimento de bactérias patogênicas, fungos e parasitas no intestino (OLIVEIRA, 1998).

2.7 Efeito bifidogênico

O crescimento do *Bifidobacterium bifidus* em presença do leite humano resulta em um carboidrato nitrogenado chamado “fator bífidus”, o qual em meio rico em lactose, produz ácido láctico, ácido acético e traços de ácido fórmico e ácido succínico, ocorrendo diminuição do pH intestinal, tornando assim o meio desfavorável ao crescimento de enterobactérias (REGO, 2002).

2.8 Microbiologia do leite humano

Como o leite humano pode ser um veículo de microrganismos patogênicos, sua qualidade microbiológica é fundamental para garantir ao lactente um alimento seguro (BORTOLOZO et al., 2004).

O leite constitui um excelente meio de cultura que permite a multiplicação de várias espécies de microrganismos (COSTA; SOUZA; SANTOS, 2004).

No leite humano, comumente são encontrados bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* (SERAFINI et al., 2003). Na quase totalidade das vezes, o mesmo microrganismo é isolado no leite humano e na pele da mama e mamilo (SERAFINI et al., 2003).

Pereira et al. (1995) relataram em um estudo, a presença de *Staphylococcus* em todas as amostras de leite materno procedentes de 19 mulheres que apresentavam sintomas de mastite. Novak et al. (2000), isolaram de 500 amostras analisadas de leite cru, 171 (34,2%) amostras contaminadas com *S. aureus*.

Quanto à patogenicidade, a microbiota do leite humano é classificada como saprófita ou patogênica (BRASIL, 1988).

Devido a importância da qualidade microbiológica e nutricional do leite humano utilizado em bancos de leite humano, tornam-se fundamentais a obtenção de dados epidemiológicos sobre a contaminação bacteriana no leite humano e o desenvolvimento de um trabalho educativo com as mães, enfermeiras, técnicos de enfermagem, nutricionistas, médicos pediatras e intensivistas, e outros profissionais ligados a essa área (SERAFINI et al., 2003).

Serafini et al. (2003), determinaram a prevalência de microrganismos indicadores e patogênicos em leite humano. Foram realizadas análises microbiológicas de 338 amostras de leite humano, 194 de leite cru e 144 pasteurizado, coletados em banco de leite humano do Hospital Materno-Infantil em Goiânia, GO. Das 194 amostras de LHO (leite humano ordenhado) não pasteurizado, 136 cepas (70,4%) de microrganismos indicadores e/ou potencialmente patogênicos, e das 144 amostras de leite pasteurizado, 73 (50,7%) apresentaram contaminação.

No leite cru, de 136 cepas isoladas, foram encontradas três (2,2%) cepas de *Streptococcus* do grupo *viridans*; 10 (7,35%) *Staphylococcus aureus*; 28 (20,59%), *S. epidermidis*; e 49 (36%) amostras contaminadas por enterobactérias. Foram isolados ainda 43 (31,6%) amostras de leite cru contaminadas por bolores e leveduras.

Das 144 amostras de leite humano pasteurizado, foram encontradas 2,7% (2 amostras) de *Staphylococcus lugdenesis*; 6,9% (5 amostras) de *Staphylococcus*

aureus; 20,6% (15 amostras) de *S. epidermis* e em 12,3% das amostras foram detectadas *Enterobacteriae*; 50,7% (37 amostras) foram positivas para bolores e leveduras (SERAFINI et al., 2003).

Bortolozo et al. (2004), estudando o padrão microbiológico do leite processado em BLH, analisaram amostras de leite do banco de Ponta Grossa-PR. As amostras foram descongeladas (“tempo zero”) e mantidas em refrigeração por 12 horas (“tempo 12”) e 24 horas (“tempo 24”). Foi repetido o padrão de aquecimento e pesquisados os microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes a 35°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp/25 mL. Para tempo “zero” todas as amostras estavam dentro dos padrões desejáveis. Nas amostras do “tempo 12” e “24 horas”, os resultados revelaram manutenção do padrão microbiológico referente a *Staphylococcus aureus*, coliformes e *Salmonella*. A população de mesófilos aumentou conforme o tempo de estocagem do leite. Na amostra 2, no “tempo 12” e no “tempo 24” tornou-se impróprio para o consumo, conforme a Resolução nº12 (BRASIL, 2001).

O estudo de Assis Neto et al. (2001), com leite humano cru encontrou na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos uma média de $5,7 \times 10^5$ UFC/mL. Na pesquisa de Pontes; Ivasaki e Oliveira (2003) analisando 27 amostras de leite humano pasteurizado, em 48,2% (13) amostras apresentaram contagens de microrganismos aeróbios mesófilos.

Mesmo que patógenos estejam ausentes, um número alto de microrganismos aeróbios mesófilos pode indicar um processamento insatisfatório, havendo condições para que os mesmos se multipliquem (FRANCO; LANDGRAFF, 2003).

No trabalho desenvolvido por Costa; Souza e Santos (2004), em amostras fornecidas pelo banco de leite humano Anita Cabral, em João Pessoa, as análises evidenciaram 100% de positividade para microrganismos mesófilos, em leite humano cru. O número de bactérias aeróbias mesófilas apresentou valores que variaram de $1,1 \times 10^2$ a $3,7 \times 10^5$ UFC/mL. Em relação aos microrganismos isolados, resultou-se em *K. pneumoniae* (25,5%), *E. coli* (1,8%), *Staphylococcus* coagulase negativa (41,8%), *S.aureus* (12,7%), *E. faecalis* (1,8%), *P. aeruginosa* (5,5%) e *C. albicans* (9,1%).

Outro estudo relatando uma contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* 010 foi realizado no ano de 2001 em uma unidade neonatal de cuidados intensivos. A fonte de

contaminação eram os frascos de armazenamento do banco de leite. A infecção afetou 31 pacientes dentro da unidade intensiva neonatal. Os leites pasteurizados que estavam nos vidros contaminados foram descartados imediatamente e técnicas de higiene foram intensificadas durante o envase do leite nos vidros. Essas medidas foram avaliadas até outubro de 2001. Não foram registrados mais casos de infecção por *P. aeruginosa* depois dos cuidados tomados (CGRAS-LE et al., 2003).

Musgrove et al. (1989), mediante tratamento térmico no leite humano, observaram redução no número de microrganismos viáveis. No leite pasteurizado foram encontradas bactérias não patogênicas, mas o leite “in natura” apresentou *Pseudomonas* e outras bactérias Gram negativas.

Segundo Moulin et al. (1998), que estudaram a avaliação bacteriológica do leite humano estocado à temperatura ambiente por 9 horas, tendo como controle as mesmas amostras mantidas sob refrigeração, a orientação dada às mães fora lavar as mãos em água corrente com sabão de coco e secá-las em toalha papel. Não foi dada nenhuma instrução em relação à limpeza das mamas. Os primeiros mililitros foram desprezados e os próximos 40 mL foram coletados em vasilhas plásticas previamente esterilizadas pela fervura em água por 15 minutos. O total de 33 amostras de leite humano foi analisado bacteriologicamente no tempo zero, três, seis, e nove horas após expressão manual. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e monitorizadas (variação entre 17°C e 30,5°C) tendo como controle o mesmo leite entre 2°C e 6°C. Foram realizadas contagens total de bactérias aeróbias facultativas mesófilas, contagens de *S. aureus* e determinação do NMP/mL (número mais provável) de bactérias coliformes totais e fecais. A análise bacteriológica do leite humano realizado no tempo zero de coleta expressou o grau de contaminação bacteriana inicial, em que a assepsia e a técnica de ordenha exercem efeito decisivo sobre a qualidade microbiológica do leite, resultando na população de microrganismos aeróbios mesófilos que variou de 2×10 UFC/mL a 10^6 UFC/mL, sendo que 85% das amostras resultaram entre 10^2 e 10^3 UFC/mL. Em 24 (vinte e quatro) amostras, 72,7% não evidenciaram coliformes totais. A presença de *Escherichia coli* foi detectada em 4 amostras (12,1%). O microrganismo *Staphylococcus aureus* foi encontrado em seis amostras (18,8%), variando de 10 a 10^4 UFC/mL.

O estudo de Novak e Almeida (2002), analisando 343 amostras de leite humano cru de banco de leite, obtidos a partir de frascos de coleta domiciliar, detectou o grupo dos microrganismos coliformes em 31,2% das amostras analisadas, com populações variando de $3,0 \times 10$ a $1,1 \times 10^4$ NMP/mL.

Lin et al. (1988), analisando o perfil microbiológico do leite humano de doadoras individuais e de um “pool” de amostras de banco de leite comercial, identificaram que todas as amostras mostraram-se negativas para coliformes. No “pool” de amostras, a contagem de coliformes alcançou valores de: $<1,0$ a $3,4 \times 10^5$. Os microrganismos isolados de doadoras individuais foram identificados como *Staphylococcus*, sendo 82% de *S. epidermis* e 10% *S. hominis* e *S. aureus*, além de outras espécies detectadas em apenas 1% das amostras. Dos microrganismos isolados do “pool” de amostras, 39% eram *S. epidermis*, 11% *Klebsiella pneumoniae*, 11% *Citrobacter* spp., 7% *Serratia liquefaciens*, 5% Gram negativos não identificados e 3% *Pseudomonas paumobilis*.

Outro estudo, analisando amostras de leite humano cru do banco de leite humano do Instituto Fernandes Figueira, recebidas em coleta domiciliar, em 837 amostras, identificou 71 (8,48%) amostras contaminadas com coliformes, porém em nenhuma das amostras a população ultrapassou $1,0 \times 10^3$ NMP/mL. Após a identificação, os resultados obtidos revelaram a presença de três gêneros e cinco espécies da família das enterobactérias. A maioria dos microrganismos (65% a 91%) pertencia a duas espécies, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo a ocorrência de *E. coli* entre 3% a 4,2%. Os resultados encontrados nessas 71 amostras foram classificados como: *E. cloacae* (56,4%), *K. pneumoniae* (35,2%), *E. coli* (4,2%), *Enterobacter sakazakii* (2,8%) e *Enterobacter taylorae* (1,4%) (NOVAK et al., 2001).

Enterobacter sakazakii tem provocado enfermidades em bebês. Entre os lactentes, os que correm maior risco de infecção por *Enterobacter sakazakii* são os recém-nascidos com idade de 28 dias ou menos, particularmente os prematuros com baixo peso ao nascer ou com imunodepressão (OMS, 2004).

Há uma elevada resistência térmica das cepas de *E. sakazakii* em comparação com outras enterobactérias podendo explicar sua alta prevalência em leite em pó e preparados (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997).

Quanto aos microrganismos *Staphylococcus* coagulase positivos (ECP), a legislação RDC nº 12 (BRASIL, 2001) para padrões microbiológicos de leite humano de banco de leite destaca a ausência de ECP, sendo que sua presença produz toxinas que quando presentes poderão causar intoxicação alimentar (SILVA; GRANDA, 2004).

Quanto à presença constante de *S.aureus* nas amostras de leite humano pode ser explicado pela colonização da pele, dos seios, da cavidade nasal da doadora e do profissional de saúde ou, alternativamente, às condições insatisfatórias de utensílios empregados na ordenha (NOVAK et al., 2000).

Apesar de ser um habitante normal da pele, contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo acima de 10^2 UFC/mL em leite humano podem ser indicativo de mastite (JAY,2005; NOVAK et al.,2000). Segundo Franco e Landgraff (2003), a presença de *S. aureus* é uma indicação de perigo potencial à saúde pública devido a enterotoxina estafilocócica termorresistente. No estudo de Carrol; Davies e Osma (1979) foram isoladas 13 amostras (6,23%) positivas para *S.aureus* das 207 amostras de leite humano pesquisadas.

No trabalho de Rodrigues (2005), o microrganismo estafilococos coagulase positivo foi identificado em 90% das amostras analisadas. Muitas amostras apresentaram contagem elevada, atingindo até $1,3 \times 10^3$ UFC/mL.

A qualidade do leite humano distribuído por BLH (bancos de leite humano) é de interesse de saúde pública (LAW et al., 1989).

2.9 Banco de leite humano

Banco de leite humano é um centro especializado obrigatoriamente vinculado a um hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades da coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou do nutricionista. É de responsabilidade dos bancos de leite o fornecimento de produtos seguros, inócuos e que cumpram a sua

função como alimento, promovendo e mantendo a saúde, principalmente ao considerar o grupo ao qual se destinam: crianças altamente vulneráveis (REGO, 2002).

Ao beneficiamento correspondem seleção, classificação, acondicionamento, pasteurização, resfriamento, rotulagem e estocagem, etapas que devem seguir as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 1988).

O LH (leite humano) deve ser distribuído de acordo com os critérios estabelecidos pela Portaria nº 322 (BRASIL, 1988). Normalmente são selecionados como receptores os lactentes que apresentam uma ou mais das indicações entre as que se seguem:

- Prematuros e recém-nascidos de baixo peso que não sugam;
- Recém-nascidos infectados, especialmente com enteroinfecções;
- Portadores de deficiências imunológicas;
- Portadores de diarreia protraída;
- Casos excepcionais a critério médico;
- Portadores de alergias a proteínas heterólogas.

Rotulagem

- Todo produto processado /estocado será obrigatoriamente rotulado.

Estocagem

- O tipo clássico de estocagem, após o tratamento de pasteurização, é o congelamento por até seis meses em freezer a -18°C.

Controle de Qualidade

A adoção de um sistema preventivo e dinâmico de controle de qualidade assume particular importância para os bancos de leite, pois reduz os riscos operacionais. Esse controle é realizado ao longo de todo o processo e baseia-se no emprego de técnicas adequadas no preparo de material, na orientação técnica aos funcionários e às

doadoras; nas condições higiênicas da coleta; na seleção e classificação; no processamento; na estocagem; na distribuição e no transporte (REGO, 2002).

Entre a seleção das doadoras, considerar-se-ão inaptas, a critério médico, as nutrízes portadoras de moléstia infecto-contagiosa; as que usam drogas ou medicamentos excretáveis pelo leite em níveis que promovam efeitos colaterais nos receptores. O leite humano é submetido a testes microbiológicos e físico-químicos para avaliação de sua qualidade (BRASIL, 2006).

Em visão mais ampla, estas características tornam o produto mais agradável, nutritivo e isento de substâncias nocivas. No leite humano, a qualidade pode ser avaliada por parâmetros físico-químicos, higiênicos sanitários e sensoriais, e pela segurança do produto observada durante todo o processamento (CARDOSO; CHAVES; BRANDÃO, 2000).

Devido à possibilidade do leite humano ser veículo de microrganismos patogênicos, sua qualidade microbiológica é importante para um produto seguro (BORTOLOZO et al., 2004).

Atualmente a pasteurização é a prática comum dos bancos de leite com a inspeção de 100% para análise qualitativa de microrganismos coliformes (CARDOSO; CHAVES; BRANDÃO, 2000).

2.9.1 A acidez titulável do leite humano

A Rede Nacional de bancos de leite humano utilizam como controle físico-químico a determinação da acidez titulável, para o controle das condições de manipulação do leite cru. A acidez titulável expressa em graus Dornic no leite deve estar entre 1,0 a 8,0 graus para ser pasteurizado (BRASIL, 2006).

A titulação do leite em graus Dornic consiste em neutralizar a acidez com solução de NaOH 0,1N ou solução Dornic, usando como indicador a solução alcoólica de fenolftaleína a 1%, até a obtenção da cor rosa clara persistente (BRASIL, 1981).

Para o leite humano foi estabelecida uma quantidade de 1 mL da amostra onde cada 0,01mL de NaOH gasto na reação equivale a 1 grau Dornic ($^{\circ}$ D) neutralizado (BRASIL, 2006).

A conservação do leite humano cru a baixa temperatura afeta a acidez titulável. Quando a temperatura diminui, passando de 20°C/3h para 4°C/48hs de armazenagem, a acidez titulável pode variar de 8 a 13 $^{\circ}$ D ou mais. Sendo a concentração de ácido láctico invariável a baixa temperatura, a acidez Dornic poderá ser diretamente influenciada pela concentração de ácidos graxos não esterificados de cadeia longa. O pH do leite humano encontra-se entre 5,47 e 7,84 e varia diretamente com as semanas de lactação e, indiretamente, com o percentual lipídico (COLLARES; GONÇALVES; FERREIRA, 1997).

Como o controle físico químico do leite humano cru requer métodos rápidos, práticos e com baixo custo operacional, o Centro de Referência Nacional dos Bancos de Leite Humano do Instituto Fernandez Figueira da Fundação Oswaldo Cruz (RNBLH/IFF/FIOCRUZ) vem promovendo estudos que visam desenvolver metodologias alternativas para o controle de qualidade do leite humano dos BLHs do Brasil (BRASIL, 2006).

Segundo Cavalcante et al. (2005), não existem na literatura especializada dados sobre acidez Dornic de leite humano cru congelado e sua relação com o binômio tempo/temperatura; nem com os teores de creme, gordura total e valor energético, e a acidez titulável como ferramenta para selecionar amostras de leite humano destinado ao consumo nos bancos de leite. Os padrões de acidez titulável medida em graus Dornic (D°) é determinada, através do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1981), pela adaptação da técnica usada em leite de vaca para leite humano.

Portanto, melhorias nas técnicas de coleta manual e de armazenamento do leite humano em congeladores domésticos com temperaturas entre -10 e -18°C, poderão reduzir a quantidade de leite humano desprezado por acidez titulável elevada (CAVALCANTE et al., 2005).

2.9.2 Pasteurização

Segundo descrição de Rego (2002), trata-se de um tratamento aplicado ao leite, que visa a inativação térmica de 100% das bactérias patogênicas e 90% de sua microbiota saprófita, por meio de um binômio de tempo-temperatura de 62,5°C, por 30 minutos ou equivalente, calculado de modo a promover a equivalência a um tratamento de 15 D para inativação térmica de *Coxiella burnetti*.

Atualmente o controle de qualidade da pasteurização é realizado através de análise microbiológica descrita nas Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano do Ministério da Saúde, que consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada (pipetadas independentemente, após agitação em vórtex por 15 segundos), em tubos de 10 mL de Caldo Verde Brilhante (CVB) a 5% p/v, com tubo de Durhan em seu interior. Após, a inoculação os tubos devem ser incubados a 36 + / -1°C por 48 horas, com replicação para tubos de CVB à concentração de 40 g/L, no caso de resultados positivos (PONTES; IVASAKI; OLIVEIRA, 2003).

Falhas no beneficiamento do leite humano não são somente um perigo presumível para as propriedades benéficas do leite humano, mas podem aumentar a susceptibilidade para conseqüentes contaminações (BJÖRKSTÉN et al., 1980).

2.9.3 Refrigeração após pasteurização

A refrigeração visa obter uma diminuição na velocidade de reprodução bacteriana e deve ser de 4°C no mínimo (WEST; HEWITT; MURPHY, 1979). Segundo Björkstén et al. (1980), na refrigeração a 4°C não há crescimento bacteriano; já entre 6 e 8°C, bactérias Gram-negativas podem multiplicar-se lentamente e deteriorar o leite. As recomendações técnicas determinam uma manutenção em refrigeração a 5°C por 24h para o leite humano pasteurizado e descongelado (BRASIL, 2006).

2.9.4 Congelamento após pasteurização

De acordo com a Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (BRASIL, 2006), uma vez pasteurizado, o leite pode permanecer até 6 meses congelado a uma temperatura máxima de -10°C (dez graus Celsius negativos).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do BLH da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Limeira

As doadoras passam por exames de saúde, não sendo aceito leite de mães com moléstias. O leite é retirado por ordenha manual, após higienização dos mamilos e mãos, armazenado por até 7 dias em congelador ou freezer e transportado em caixas de isopor com gelo reciclável até o BLH.

Na recepção do leite é realizado teste de acidez, com o acidímetro de Dornic: os valores médios são de 3 a 4°D, podendo se aceitar valores menores que 8°D. A pasteurização ocorre em frascos com 300 mL de leite em cada um. Há um frasco controle, com termômetro para verificação da temperatura, que deve atingir 62,5°C no período de 30 minutos.

Os frascos são colocados em imersão em água destilada e álcool com a temperatura de 5°C para rápido resfriamento.

3.2 Amostragem

A pesquisa foi realizada em leite maduro (obtido a partir do 15º dia pós-parto, em média). Foram fornecidas 60 amostras de 20 mL de leite humano cru congelado de diferentes doadoras com excedente de produção láctea. As amostras individuais de 20 mL de leite foram acondicionadas em frascos de vidro esterilizado com tampa. As amostras foram transportadas ao laboratório da Escola Superior de Agricultura ESALQ-USP, em Piracicaba, em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, no período de no máximo 1 hora, com uma temperatura máxima de 4°C.

Para que este estudo fosse concretizado, foi necessária aprovação do Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Limeira, de acordo com a resolução 196

(BRASIL, 1996) do Conselho Nacional da Saúde, Diretrizes e Normas Regulamentadoras envolvendo seres humanos e também que as mães envolvidas assinassem um termo de consentimento livre e esclarecido para a doação do leite destinado ao estudo (APÊNDICE B).

3.3 Caracterização microbiológica do leite coletado

Foram realizadas a contagem de *Staphylococcus* coagulase + e contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos; coliformes totais e *Escherichia coli*. Foram feitas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-7} , em tubos com água salina peptonada estéril, contendo 9 mL.

3.3.1 *Staphylococcus coagulase* positivo (+)

Para contagem de ECP foi utilizado o método de contagem direta em placas, semeadura em superfície e espalhamento com alça de Drigalski, descrito por Downes e Ito (2001). Foi inoculado 1,0 mL da amostra de leite, distribuído por 3 placas de ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secas, com emulsão de ovo salina mais solução aquosa de telurito de potássio a 1%, sendo 3 com 0,3mL; uma com 0,1mL. Inoculou-se em duplicata 0,1mL da amostra com diluições de 10^{-3} e 10^{-4} . Espalhou-se o inóculo com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica. Contaram-se as colônias típicas: negras, pequenas, com halo translúcido ao seu redor. Estas colônias foram submetidas aos testes de catalase, coloração de Gram e coagulase.

Para o teste de catalase foi adicionado em uma lâmina de vidro para microscopia, parte da colônia suspeita e adicionada solução de H_2O_2 a 3% sendo positivo para as colônias que borbulharam.

As colônias selecionadas foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion- Infusão de cérebro e coração), incubada a 35°C/24 horas. Parte deste cultivo foi transferida com alça microscópica para uma lâmina de microscopia. Foram feitos esfregaços seguindo a técnica de coloração de Gram, sendo positivas as colônias que apresentaram coloração azul e cocos em forma de cacho irregulares.

Para o teste de coagulase foram colocados em um tubo de ensaio previamente estéril, 0,2 mL do cultivo do caldo BHI com 0,5 mL de Plasma-EDTA, plasma de coelho com EDTA, incubados em banho-maria a 37°C/4 h observando-se a formação do coágulo; o resultado foi expresso em UFC/mL.

Inoculação em placas com BP

(continua)

Figura 1 – Plaqueamento em meio B.P. e teste de coagulase.

Teste de coagulase

(conclusão)

Figura 1 – Plaqueamento em meio B.P. e teste de coagulase.

3.3.2 Contagem global de microrganismos aeróbios totais

Para determinação da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, foram realizadas diluições decimais em tubos, com água peptonada estéreis. As diluições decimais foram de 10^{-1} a 10^{-7} .

Segundo Downes e Ito (2001), alíquotas de 1,0 mL foram inoculadas em profundidade em Plate Count Agar (PCA) em duplicata e incubadas a 35°/48 horas em estufa bacteriológica, considerando-se para a contagem as placas que continham entre 25 e 250 colônias. O resultado foi expresso em UFC/mL.

Plaqueamento com PCA

Figura 2 – Plaqueamento em meio P.C.A.

3.3.3 Contagem de microrganismos do grupo coliforme total e *Escherichia coli*

Seguiu-se a metodologia segundo Downes e Ito (2001) em diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-7} , em tubos com água peptonada estéreis. Utilizou-se para contagem a técnica do número mais provável, série de 3 tubos. Os microrganismos coliformes totais e *E. coli* foram determinados pelo meio LST-MUG Test (Lauril Sulfato Triptose modificado com MUG-4-metil umbeliferil- β -D-glucuronídeo). O meio LST-MUG Test para coliformes totais e *E. coli* contém MUG que é um substrato fluorescente.

Após o período de 24-48h, foi realizada a leitura dos tubos que indicaram formação de gás e então foram expostos à luz ultravioleta (6 w e $\lambda = 325\text{nm}$). Os tubos com fluorescência azul foram considerados positivos, pois a *E. coli* hidrolisa o MUG, liberando 4-metilumbeliferona, que exibe fluorescência verde azulada sob a luz ultravioleta.

Após a leitura dos tubos na luz de UV, todos os tubos que apresentaram formação de gás foram inoculados com alça microbiológica em meio Verde Brilhante Bile a 2% em tubos com tubos de Durhan invertidos à de 35°C por 24-48 h, em estufa bacteriológica verificando-se a formação de gás e confirmação da presença de coliformes totais.

Os tubos que apresentaram formação de gás foram contados como positivos a partir da tabela dos NMP/mL (números mais prováveis). Os resultados foram expressos em NMP/mL .

Figura 3 – Determinação de coliformes em meio LST- MUG.

Figura 4 – Determinação de *Escherichia coli* em câmara de fluorescência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos a partir das amostras de leite humano fornecidas:

Tabela 2 – Contagens microbiológicas no leite humano cru.

(continua)

Amostra	<i>E. coli</i> NMP/mL	Coliformes NMP/mL	Mesófilos UFC/mL	ECP UFC/mL
1	<0,3	<0,3	$4,8 \times 10^2$	$0,4 \times 10$
2	<0,3	<0,3	$5,1 \times 10^2$	<0,1
3	<0,3	<0,3	$3,1 \times 10$	8,0
4	0,4	0,4	1,0	6,0
5	$4,6 \times 10$	$4,6 \times 10$	$2,7 \times 10^4$	$>10^2$
6	<0,3	<0,3	$1,5 \times 10$	<1,0
7	2,3	$4,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	<1,0
8	$4,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$>10^2$
9	$2,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^7$	$>10^2$
10	<0,3	<0,3	$1,2 \times 10^4$	<1,0
11	<0,3	<0,3	$4,7 \times 10^4$	<1,0
12	<0,3	<0,3	$4,4 \times 10^5$	<1,0
13	<0,3	0,9	$2,1 \times 10^3$	<1,0
14	<0,3	9,3	$5,3 \times 10^2$	<1,0
15	<0,3	$7,5 \times 10^2$	$5,6 \times 10^4$	<1,0
16	<0,3	$4,3 \times 10^2$	$7,0 \times 10^5$	<1,0
17	<0,3	7,5	$1,8 \times 10^2$	<1,0
18	<0,3	$2,4 \times 10^2$	$5,9 \times 10^4$	3,0
19	<0,3	<0,3	$2,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10$
20	<0,3	<0,3	$5,2 \times 10^5$	5,0
21	0,4	0,7	$1,7 \times 10^2$	$3,0 \times 10$
22	<0,3	<0,3	$4,6 \times 10^2$	5,0
23	0,4	$0,9 \times 10$	$3,7 \times 10^1$	$4,0 \times 10$
24	$0,9 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	<1
25	$2,4 \times 10^1$	$2,4 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	<1
26	2,3	$7,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10$	$1,4 \times 10$

(conclusão)				
Amostra	<i>E. coli</i> NMP/mL	Coliformes NMP/mL	Mesófilos UFC/mL	ECP UFC/mL
27	2,3	$9,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$3,3 \times 10^1$
28	2,3	$2,4 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$	9,0
29	2,3	$2,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10$
30	2,3	$9,3 \times 10$	$2,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$
31	0,4	0,4	$8,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10$
32	0,4	0,4	$1,1 \times 10^5$	2,0
33	7,0	1,1	$5,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10$
34	4,0	0,4	$3,5 \times 10^5$	<1
35	9,0	9,3	$1,1 \times 10^5$	<1
36	$2,3 \times 10$	2,8	$1,0 \times 10^5$	<1
37	<0,3	4,3	$4,8 \times 10^4$	<1
38	<0,3	<0,3	<1	$1,0 \times 10$
39	0,4	2,1	$9,4 \times 10^3$	<1
40	<1	1,5	$1,5 \times 10^2$	<1
41	0,4	0,7	$5,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
42	0,7	1,5	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
43	0,9	9,3	$1,0 \times 10^5$	<1
44	0,4	9,3	$1,4 \times 10^4$	<1
45	<0,3	$1,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4$	3,0
46	<0,3	9,3	$1,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10$
47	<0,3	<0,3	<1	4
48	<0,3	0,4	$1,0 \times 10$	<1
49	<0,3	<0,3	$0,7 \times 10$	<1
50	<0,3	<0,3	$4,5 \times 10$	<1
51	<0,3	0,4	$5,4 \times 10^3$	<1
52	<0,3	0,9	$1,0 \times 10^1$	<1
53	<0,3	<0,3	$2,5 \times 10^3$	1
54	<0,3	0,4	$3,0 \times 10$	<1
55	<0,3	$7,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^6$	<1
56	0,9	$7,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^6$	<1
57	2,3	$2,3 \times 10^2$	$8,6 \times 10^6$	19
58	0,9	$4,6 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	<1
59	2,3	$1,1 \times 10^4$	$9,8 \times 10^5$	<1
60	2,3	$2,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$	<1

Tabela 3 – Distribuição da frequência da população de microrganismos nas amostras positivas de leite humano analisadas.

Micror- ganismos.	+/n	% Total	1 a 99	10 ² a 9,9x10 ²	10 ³ a 9,9x10 ³	10 ⁴ a 9,9x10 ⁴	10 ⁵ a 9,9x10 ⁵	10 ⁶ a 9,9x10 ⁶	10 ⁷ a 9,9x10 ⁷
<i>E. coli</i> NMP/mL	30/60	50,00	28 93,33%	<0,3	<0,3	1 3,33%	1 3,33%	<0,3	<0,3
Coliformes totais NMP/mL	45/60	75,00	26 57,77%	11 24,4%	1 2,22%	4 8,88 %	2 4,44%	1 2,22%	<0,3
Mesófilos UFC/mL	58/60	96,66	10 17,24%	10 17,24%	6 10,34%	15 25,86 %	10 17,24%	6 10,34%	1 1,72%
ECP ¹ UFC/mL	28/60	46,66	22 78,57%	1 3,57%	3 10,71%	2 7,14%	<1,0	<1,0	<1,0

Figura 5 – Distribuição das frequências das populações de *E. coli* nas amostras positivas (NMP/mL).

¹ Estafilococos coagulase positivo

Como indica a Tabela 2, em relação ao microrganismo *Escherichia coli*, o resultado deste estudo encontrou 50% (30 amostras) contaminadas, embora apresentando populações pequenas na maioria delas. Na Figura 5, que ilustra a frequência das populações, encontram-se: 93,33% (28 amostras) das amostras contaminadas com populações de 1 a 99 NMP/mL; 3,33% (1 amostra) com população de 10^4 a $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; 3,33% (1 amostra) com populações de 10^5 a $9,9 \times 10^5$ NMP/mL.

Os autores Serafini et al. (2003) relataram que, de 194 amostras de LHO (leite humano ordenhado) cru não pasteurizado, foi encontrada contaminação em 70,4% das amostras com microrganismos indicadores e/ou patogênicos, sendo 1,66% (3 amostras) contaminadas por *E. coli*. Das 144 amostras de leite pasteurizado analisadas, foram encontradas 73 amostras (50,7%) apresentando contaminação; sendo que 2,7% (2 amostras) com *Staphylococcus lugdenensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* do grupo *viridans*; 6,9% (5 amostras) com *S. aureus*; 20,6% (15 amostras) com *S. epidermis* e 12,3% das amostras foram detectadas enterobactérias. Ainda 50,7% (37 amostras) foram positivas para bolores e leveduras.

Em outro estudo, Pontes; Iwasaki e Oliveira (2003) analisaram 27 amostras de leite humano pasteurizado e verificaram que 25,9% (7 amostras) foram positivas para coliformes fecais.

Segundo Novak et al. (2001), em estudo sobre microrganismos do grupo coliformes de 837 amostras de leite ordenhado, oriundas do banco de leite humano do Instituto Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, somente (4,2%) foram positivas para *E. coli*.

Esses estudos verificaram uma contaminação bem menor do que a presente pesquisa, a qual encontrou 50% das amostras contaminadas pelo microrganismo *Escherichia coli*.

Costa; Souza e Santos (2004) encontraram 1,8% de amostras positivas para *E. coli* em 30 amostras de leite humano cru do banco de leite de João Pessoa, PB. A amostra com maior contagem apresentou $2,4 \times 10^2$ UFC/mL.

Comparando os estudos de Costa; Souza e Santos (2004) e Novak et al. (2001), observa-se que os resultados obtidos desses estudos apresentaram-se com menor

ocorrência do microrganismo *Escherichia coli* que o presente estudo no qual 50% das amostras foram positivas.

Durante o aleitamento materno diretamente ao seio da mãe, não há transferência destes microrganismos, que são contaminantes secundários, isto é, a sua presença é indicativa de contaminantes externos provenientes de manipuladores, utensílios e equipamentos (PONTES; IVASAKI; OLIVEIRA, 2003).

Em outro estudo, Moulin et al. (1998) relataram que no leite humano, no tempo zero de coleta, a presença do microrganismo *E. coli* foi detectada em 12,1% (4 amostras).

Considerando-se que o leite humano doado é submetido ao processo de pasteurização e manutenção da cadeia do frio, após a pasteurização de acordo com as diretrizes da RNBLH (Rede Nacional de Bancos de Leite Humano), tais procedimentos tornarão o produto analisado por este presente estudo adequado ao consumo a que se destina, dada a reduzida população encontrada na maioria das amostras. Nos bancos de leite humano, após a pasteurização o leite processado é submetido ao teste CVB a 5% p/v, com tubo de Durhan em seu interior, para a pesquisa de coliformes. Segundo Pontes; Ivasaki e Oliveira (2003), este teste confirmará a qualidade do leite após a pasteurização, pois se ocorrer presença de microrganismos, o leite pasteurizado será descartado.

Mas, salienta-se que, a presença de *E. coli* no leite humano de banco de leite é indicativa de contaminação de origem fecal e observa-se que as amostras desse estudo indicam problemas higiênico-sanitários (FRANCO; LANDGRAFF, 2003).

Figura 6 – Distribuição das freqüências das populações de coliformes totais nas amostras positivas (NMP/mL).

Na Tabela 2, observa-se que nas amostras analisadas foram encontradas 75% das amostras positivas para microrganismos coliformes totais.

Na Figura 6, observa-se a distribuição da freqüência das populações de coliformes totais nas amostras analisadas. Em 57,77% (26 amostras) apresentaram populações entre 1 a 99 NMP/mL; em 24,4% (11 amostras) com populações entre 10^2 e $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; em 2,22% (1 amostra) com populações de 10^3 a $9,9 \times 10^3$ NMP/mL; em 8,88% (4 amostras) com populações de 10^4 a $9,9 \times 10^4$ NMP/mL; em 4,44% (2 amostras) com populações de 10^5 a $9,9 \times 10^5$ NMP/mL; em 2,22% (1 amostra) com população de 10^6 a $9,9 \times 10^6$ NMP/mL. Quanto à qualidade do leite humano ordenhado deste estudo, após a pasteurização ele provavelmente atingiria os padrões da legislação quanto à ausência de coliformes a 35°C requerida para o leite humano pasteurizado, na maioria das amostras.

Segundo o estudo de Bortolozo et al. (2004) com 5 amostras de leite humano processado do Instituto de Ponta Grossa/PR, não foram detectados coliformes.

Enquanto que no estudo de Pontes; Ivasaki e Oliveira (2003), na avaliação microbiológica de leite materno processado em 27 amostras, detectou-se contaminação com coliformes totais em 33,3% das amostras positivas.

No estudo de Serafini et al. (2003) houve detecção de coliformes em 21,1% das amostras de leite humano cru e em 5,6% das amostras de pasteurização, mostrando que a eficiência da pasteurização pode ser comprometida por uma carga microbiana inicial elevada.

No estudo de Costa; Souza e Santos (2004), em 15 amostras de leite pasteurizado rejeitadas pelo controle de qualidade do banco de leite humano Anita Cabral (BLHAC), 20% (3 amostras) delas foram positivas para coliformes totais, 40% para microrganismos aeróbios mesófilos e 13% para *Bacillus cereus*.

Um outro estudo realizado com 343 amostras de leite humano ordenhado, obtidas a partir de frascos oriundos de coleta domiciliar, recebidos pelo banco de leite humano do Instituto Fernandez Figueira – IFF, os microrganismos do grupo coliformes totais foram detectados em 31,2% das amostras analisadas, com populações de coliformes variando de $3,0 \times 10$ a $1,1 \times 10^4$ NMP/mL (NOVAK; ALMEIDA, 2002).

Novak et al. (2001) verificaram que de 837 amostras de leite ordenhado, 31% estavam contaminadas com coliformes. Identificaram 0,23% de amostras positivas para *E. sakazakii*. Recentemente cepas de *E. sakazakii* começaram a ser associadas à infecção em neonatos (SIMMONS et al., 1989).

Os estudos de Lin et al. (1988) encontraram um resultado negativo para coliformes em amostras de leite humano cru de 10 (dez) doadoras individuais. Mas, na amostras em “pool”, a contagem para coliformes alcançou valores de <1 a $3,4 \times 10^5$ UFC/mL, tendo como média $6,8 \times 10^4$ UFC/mL.

Os resultados obtidos por Moulin et al. (1998), apresentaram população de coliformes totais de zero a 15 NMP/mL, sendo que, em 24 amostras (72,7%) não evidenciaram coliformes totais.

Rodrigues (2005) analisou 60 amostras de leite humano cru de BLH encontrando (20%) 12 amostras positivas para coliformes totais.

No presente estudo encontrou-se uma maior porcentagem de amostras positivas para coliformes (75%), salientando a importância da educação das mães doadoras quanto às técnicas de manipulação e armazenamento do LHO (leite humano ordenhado), segundo a RNBLH (Rede Nacional de Bancos de Leite Humano).

Figura 7 – Distribuição das frequências das populações de microrganismos aeróbios mesófilos positivos encontrados nas amostras positivas (UFC/mL).

Neste estudo, conforme Tabela 1, os resultados obtidos em relação aos microrganismos aeróbios mesófilos foram positivos em 96,66% das amostras analisadas (58 amostras). Apenas 17,24% (10 amostras) apresentaram populações de 1 a 99 UFC/mL, enquanto 17,24% (10 amostras) apresentaram populações de 10^2 a $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; em 10,34% (6 amostras) foram detectados de 10^3 a $9,9 \times 10^3$ UFC/mL; 25,86% (15 amostras) apresentaram entre 10^4 e $9,9 \times 10^4$ UFC/mL; 17,24% (10 amostras) entre 10^5 e $9,9 \times 10^5$ UFC/mL; 10,34% (6 amostras) ficaram entre 10^6 e $9,9 \times 10^6$ UFC/mL; 1,72% (1 amostra) entre 10^7 e $9,9 \times 10^7$ UFC/mL. A Figura 7 mostra a distribuição da população desses microrganismos.

O estudo de Pontes; Iwasaki e Oliveira (2003) encontrou 13 amostras (48,2%) positivas para os microrganismos aeróbios mesófilos em leite humano pasteurizado.

Apesar dos melhores resultados citados e os obtidos no presente estudo, populações maiores não significam necessariamente falhas no processamento do leite de banco, pois é normal o leite conter bactérias aeróbias mesófilas.

Resultados semelhantes a este estudo ocorreram na avaliação de 24 amostras de leite materno do banco da Maternidade Evangelista Rosa (Teresina, PI), onde 96% das amostras analisadas foram positivas quanto à presença de microrganismos

aeróbios mesófilos (ASSIS NETO et al., 2001). No presente estudo foram detectados microrganismos aeróbios mesófilos em 96,6% das amostras analisadas.

Segundo Assis Neto et al. (2001), os resultados encontrados no estudo em relação aos microrganismos aeróbios mesófilos nas amostras de leite humano cru apresentaram uma população média de $5,7 \times 10^5$ UFC/mL.

Outro trabalho, analisando 30 amostras de leite cru pelo banco de leite humano Anita Cabral, apresentou 100% de positividade para bactérias aeróbias mesófilas, com contagens que variaram entre $1,1 \times 10^2$ e $3,7 \times 10^5$ UFC/mL. Nas amostras de leite humano pasteurizado, 40% (15 amostras) foram rejeitadas pelo controle da qualidade do banco de leite, pois eram positivas para microrganismos aeróbios mesófilos (COSTA; SOUZA; SANTOS, 2004).

O estudo de Moulin et al. (1998) relatou, no tempo zero de coleta de leite humano cru, uma população que variou de 2×10 a 10^6 UFC/mL de microrganismos aeróbios mesófilos.

Rodrigues (2005) encontrou 56 amostras positivas para microrganismos aeróbios mesófilos no leite humano cru de banco de leite humano, representando 93,33% das amostras analisadas. As populações encontradas apresentaram populações reduzidas, sendo que apenas uma amostra atingiu a população de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL.

Mesmo que o alimento não tenha sofrido alterações organolépticas, um número elevado de microrganismos aeróbios mesófilos indica que houve condições para que os patógenos, se presentes, se multiplicassem, podendo chegar a níveis perigosos, principalmente porque a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar é mesófila (FRANCO; LANDGRAFF, 2003).

O resultado microbiológico deste estudo destaca que o leite humano apresenta uma contaminação microbiana, sugerindo que existe risco de alteração da qualidade do leite em algumas amostras.

Provavelmente, a maioria das amostras desse estudo estaria dentro do padrão da legislação RDC nº 12 (BRASIL, 2001) após a pasteurização, visto que somente 27,7% do leite analisado apresentaram populações de microrganismos aeróbios mesófilos elevadas, isto é, acima ou igual a 10^6 UFC/mL.

O grupo de microrganismos aeróbios mesófilos inclui a maioria dos contaminantes presentes, permitindo uma visão do padrão microbiológico do leite (MARSHAL, 1992).

Pela população de microrganismos aeróbios mesófilos obtidos em 96,66% das amostras analisadas, o presente estudo salienta a importância de boas práticas de manipulação e de armazenamento do LHO (leite humano ordenhado).

Figura 8 – Distribuição das populações de *Staphylococcus coagulase* positivo encontrados nas amostras (UFC/mL).

Na Tabela 2, observa-se que das 60 amostras de leite humano cru analisadas, 46,66% foram positivas para *Staphylococcus coagulase* positiva.

Na Figura 8, observa-se a distribuição da frequência nas amostras, onde o resultado encontrado foi de: 78,57% (22 amostras) com populações de 1 a 99 UFC/mL; 3,57% (1 amostra) com populações de 10^2 a $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,71% (3 amostras) com populações de 10^3 a $9,9 \times 10^3$ UFC/mL e 7,14% (2 amostras) com populações de 10^4 a $9,9 \times 10^4$ UFC/mL.

Esse resultado é facilmente explicável, visto que o microrganismo *Staphylococcus aureus* é encontrado na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40% e na boca e saliva, de 10 a 35% (SERAFINI et al., 2003).

Assim, sua presença no leite humano cru pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e das fossas nasais das doadoras. A maior preocupação quanto a sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de enterotoxinas resistentes ao calor (JAY, 2005).

Pereira et al. (1995) relataram a presença de *Staphylococcus* em todas as amostras do leite materno procedentes de 19 mulheres com sintomas de mastite. Das 19 cepas isoladas, oito sintetizavam quantidades detectáveis de enterotoxinas. As populações encontradas de *Staphylococcus* coagulase positiva (ECP) foram de 10^2 a 10^4 UFC/mL. Em alimentos é aceito que a população de *Staphylococcus aureus* possa multiplicar-se e atingir uma população de até 10^6 UFC/mL para que haja produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para causar um quadro de intoxicação (MILIOTS; BIER, 2003).

Em relação ao leite humano cru, os resultados do estudo de Serafini et al. (2003) que encontraram 7,35% (10 amostras) foram semelhantes ao de Carrol; Davies e Osma (1979), que observaram *S. aureus* em 13 amostras (6,2%) das 207 de leite humano pesquisados.

No estudo de Moulin et al. (1998), as amostras provenientes do tempo zero de coleta apresentaram *Staphylococcus aureus* em 18,8% (6 amostras) analisadas.

Pontes; Iwasaki e Oliveira (2003) encontraram no estudo 12 amostras positivas (44,4%) e Serafini et al. (2003) encontraram 5 amostras positivas (6,9%) contaminadas com ECP, ambos em leite humano pasteurizado.

Rodrigues (2005) encontrou 54 (90%) amostras positivas para ECP (*Staphylococcus* coagulase positivo) o que foi superior ao presente estudo, onde somente 46,6% (28 amostras) estavam positivas para ECP. Os resultados encontrados por Costa, Souza e Santos (2004) encontraram 12,7% das amostras contaminadas com *Staphylococcus aureus* no leite humano cru e 7% das amostras contaminadas eram provenientes do leite humano pasteurizado. Neste estudo encontraram-se as seguintes populações: 78,57% das amostras positivas entre 1 a 99 UFC/mL; 3,57%

apresentaram entre 10^2 e $9,9 \times 10^2$ UFC/mL; 10,71 % (3 amostras) entre 10^3 e $9,9 \times 10^3$ e 7,14% apresentaram de 10^4 a $9,9 \times 10^4$ UFC/mL.

A RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nº12 (BRASIL, 2001) estabelece como ausência o padrão de referência para ECP no leite humano pasteurizado, uma vez que sua presença em alimentos pode indicar deficiência de processamento ou de condições inadequadas do processo. Além do mais, este microrganismo produz toxinas, que presentes, podem causar intoxicação alimentar (SILVA; GANDRA, 2004).

No caso de enterotoxinas, há necessidade de um número considerável de células de 10^5 e 10^6 UFC/mL para que haja produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para haver quadro de intoxicação (MILIOTS; BIER, 2003). Comparando-se o resultado obtido, a conclusão deste estudo apresenta segurança do leite, pois a população maior encontrada foi de 10^4 UFC/mL. Contudo, deve ser lembrado que o leite humano é destinado ao consumo de uma população altamente vulnerável, que são crianças recém-nascidas em UTI (Unidade de Tratamento Intensivo).

A RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nº12 (BRASIL, 2001) prevê sua ausência de ECP no leite humano pasteurizado, que também provavelmente seria alcançado nas amostras analisadas por este estudo. O risco que permanece é a toxina, que uma vez secretada no leite e sendo termorresistente, permaneceria no produto pasteurizado.

Assim, são sugeridos cuidados higiênicos aos manipuladores de leite humano, já que esse microrganismo é naturalmente encontrado na pele e fossas nasais de manipuladores e são indicadores da qualidade sanitária do produto.

5 CONCLUSÕES

- Nas amostras analisadas, o *E. coli* foi positivo em 50% e os coliformes totais em 75% das amostras, sendo sugestivo de falhas na manipulação do produto pelas doadoras.
- O resultado de 46,66% de amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase positivo apresenta-se próximo aos encontrados em outros estudos.
- A maioria das amostras contaminadas apresentou contagens reduzidas dos microrganismos estudados.
- Os resultados obtidos por este estudo ressaltam a importância de práticas adequadas de manipulação e armazenamento do leite humano cru devido às suas características nutricionais, à garantia de qualidade e à segurança do alimento.
- Este estudo ressalta a importância do beneficiamento ao qual o leite humano recebe em bancos de leite, onde a pasteurização é fundamental para que o produto seja seguro do ponto de vista microbiológico, por ser utilizado em neonatos prematuros de UTI's (Unidade de terapia intensiva).

REFERÊNCIAS

AKRÉ, J. **Alimentação infantil**: bases fisiológicas. Panamá: Instituto de Nutrition de Centro de América y Panamá, 1990. p. 19-53

ANDERSON, L.; DIBBLE, M.V.; TURKKI, P. R.; MITCHELL, H.S.; RYNBERGEN, J.H. **Nutrição**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 737p.

ASSIS, M.A.A.; SANTOS, E.K.A.; SILVA, D.A.G.V. Planejamento de banco de leite humano e central de informação sobre aleitamento materno. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 1-10, out. 1983.

ASSIS NETO, A.C.; PEREIRA, G.M.M.; PEREIRA, G.T.; SANTOS, M.C.M. Perfil microbiológico do leite materno do banco de maternidade Evangelina Rosa - Teresina, PI. **Boletim do Centro de Pesquisa Processamento Alimentar**; Curitiba, v.19, n. 1, p. 75-84, jan./jun. 2001.

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

BORGIO, L.A.; RAMOS, K.L.; ALMEIDA, S.G. de; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, L. A. de; ARAÚJO, W.M.C. Avaliação do funcionamento e identificação dos pontos críticos de controle em bancos de leite do Distrito Federal, Brasília (1999-2000). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 43-49, mar. 2005.

BORTOLOZO, E.A.F.Q.; PIETROSKI, G.; BAGGIO, R.; CÂNDIDO, L. M. B. Padrão microbiológico e sanitário do leite humano, processado em banco de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 85-88, jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura Abastecimento e Pecuária. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal-LANARA. **Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes.** Brasília, 1981. 2v.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 322, de 26 de maio de 1988. **Aprova as normas gerais para regular a instalação e funcionamento de bancos de leite humano.** Disponível em: <http://www.elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRint_VERSION&id>. Acesso em: 11 fev. 2006.

_____. Resolução n. 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial, Brasília, 10 jan. de 2001. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 10 jan. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para a saúde utilizando seres humanos. **Diário Oficial**, Brasília, 16 de out. de 1996. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/das/resoluções/reso196.doc>> Acesso em: 02/06/2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. **Manual Técnico: seleção e classificação do leite (RNBLH - Rede Nacional de Bancos de Leite Humano).** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/>>. Acesso em: 20 jan. 2006

BRITTO,M.G.M.; BARBOSA,L.M.; MERCHAN-HAMANN,E. Avaliação sanitária dos bancos de leite humano da rede hospitalar do Distrito Federal. **Revista Saúde**, Brasília, v.13, n.314, p.17-18, jul/dez. 2002

CARDOSO, R.C.V.; CHAVES, J.B.P.; BRANDÃO, S.C.C. Bancos de Leite humano e segurança no beneficiamento de produtos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.68/69, p. 51-57, jan./fev. 2000.

CGRAS-LE, G.; LEPELLETIER, D.; DEBILLON, T.; GOURNAY, V.; ESPAZE, E.; ROZE, J.C. Contamination of a milk bank pasteurizer causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. **Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal**, Nante Cedex, v. 88, n. 5, p. 434-435, Oct. 2003.

CARROL, L.; DAVIES, D.P.; OSMA, N.M.; Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. **Lancet**, London, v.314, n.6, p.732-733, Oct. 1979.

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, p. 1-12, jan./mar. 2005.

COLLARES, F.P.; GONÇALVES, C.V.; FERREIRA, J.S. Creamatocrit as a rapid method to estimate the contents of total milk lipids. **Food Chemistry**, Barking, v. 60, n. 40, p. 465-467, 1997.

COSTA, A.C.da; SOUZA, C.P.; SANTOS FILHO, L. Caracterização microbiológica do leite humano processado em banco de leite de João Pessoa, PB. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, João Pessoa, v. 36, n. 4, p. 225-229, 2004.

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

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

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.

GALHARDO, A.L.S.M.; ARAUJO, V.M.C.; BORGIO, L.A. Acidez Dornic como parâmetro de qualidade, em bancos de leite humano. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 16-27, set. 2002.

GIUGLIANI, E.R.J. Rede nacional de bancos de leite humano do Brasil: tecnologia para exportar. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 183-184, 2002.

GRASSI, M.S.; COSTA, M.T.Z.; VAZ, F.A.C. Fatores imunológicos do leite humano. **Pediatria**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LAW, B.J.; URIAS, B.A.; LERTZMAN, J.; ROBSON, D.; ROMANCE, L. Is ingestion of milk- associated bacteria by premature infants fed raw human milk controlled by routine bacteriological screening?. **Journal Clinical Microbiological**, Manitotoba, v. 27 n. 7 p., 1560-1566, July 1989.

LIN, J.F.; BARNHART, H.M.; BAILEY, J.S.; COX, A.N.; EITENMILLER, R.R. Bacteriological profiles of human milk from individual donors and pooled samples from a commercial milk bank. **Journal Food Protection**, Ames, v. 51, n. 6, p. 467-470, June 1988.

LÖNNERDAL, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, n. 42, p.1299-1317, Dec. 1985.

MAHAN, L.K.; ESCOTT- STUMP, S. (Ed) **Krause** : alimentos, nutrição e dietoterapia. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002. 1157p.

MARSHAL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products: pathogens in milk and milk product.** New York: American Public Health Association, 1992. p.103-125.

MILIOTS, M.D.; BIER, W. F. **International handbook of foodborne pathogens.**, New York, 2003, 839p.

MOULIN, S.Z.; LAMOUNIER, J.A.; VIEIRA, M.B.C.M.; BAÊTA, M.; SILVA, M.A.D.; ARAUJO, R.S.S. Contaminação bacteriana do leite humano coletado por expressão manual e estocado à temperatura ambiente. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.74, n. 5, p. 376-382, 1998.

MUSGROVE, M.T.; HARRISON, M.A.; BARHNART, H.M.; TOLEDO, R.T.; EITENMILLER, R.R. Microbiological examination of pasteurized, deaerated human milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.8, p.552- 559, Aug., 1989.

NAZAROWEC-WHITE,M.; FABER, J.M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. **Letters in Applied Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 9-13, 1997.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.de. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 193-196, 2002.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.de; ASENSI, M.D.; MORAES, B.A.; RODRIGUES, D.P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 1-9, maio/ jun. 2001.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.de; WARNKEM, M.B.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; HAGLER, A.N. Methicilin-resistant a *Staphylococcus aureus* in human milk. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 29-33, jan. / fev.2000.

OLIVEIRA, J. E. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. ***Enterobacter sakazakii* y outros microorganismos em los preparados em polvo para lactentes**. Roma, 2004. 66p. (Série de Evaluacion de Riesgos Microbiológicos. n.6).

PASCHOA, M.F. Pasteurização do leite materno: vantagens e desvantagens. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 50, p. 18-22, jul./ago. 1997.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; SELLOS, I.T.; BERGDOLL, M.S. *Staphylococci* in breast milk from women with and without mastitis. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 117-120, 1995.

PONTES, M.R.; IVASAKI, Y.; OLIVEIRA, Y.S. Avaliação das condições sanitárias do leite humano pasteurizado distribuído pelo banco de leite de um hospital público do Distrito federal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 43-49, abr. 2003.

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

RODRIGUES, M.A.M.; ABDALLAH, V.O.S.; OLIVEIRA, A.M.M.; PÂNTANO, E.C. Determinação da resistência do leite humano ao Alizarol. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 126/127, p. 78-81, nov./dez. 2004.

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

SALVIANO, S.; CAVALCANTE, A.M. Leite materno é saúde. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, n. 67, p. 8;10-11, jul./ago. 2004.

SCHANLER, R.J. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. **Seminars in Perinatology**, Huston, v. 13, n. 2, p. 69-77, Apr. 1989.

SERAFINI, A.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RODRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBE, T.F.N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Saúde Pública**, Goiânia, v.37, n. 6, p. 775-779, dez. 2003.

SILVA, D.G.; SÁ, C.M.M.N.; PRIORE, S.E.; FRANCESCHINI, S.C.C.; DEVINCENZI, M.U. Ferro no leite materno: conteúdo e biodisponibilidade. **Nutrire**, São Paulo, v.23, p.93-107, jun. 2002.

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

SIMMONS, B.P.; GELFAND, M.S.; HAAS, M.; METTSL, F.J. Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Memphis, v. 10, p. 308-401, 1989.

TULLY, M.R. Excelência em Bancos de Leite Humano: Uma visão do futuro - The first international congress on human milk banking. **Journal Human Lactation**, North Carolina, v.17, n. 1, p. 51-53, 2001

UNICEF. Fundo das Nações Unidas para a Infância. **Declaração dos direitos da criança**, 1988. Disponível em : <http://www.unicef.org/brazil/decl_dir.htm> Acesso em : 02/06/2006

VINAGRE, R.D. **O leite humano e sua importância na nutrição do recém-nascido prematuro**. São Paulo: Atheneu, 2002. 142p.

WEST, P.A.; HEWITT, J.H.; MURPHY, O.M. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. **Journal of Food Bacteriology**, London, v.46, p. 269-77, 1979.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Bancos de Leite Humano existentes e a implantar no Estado de São Paulo.

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Maria Rita, escrevo-lhe para que você faça parte da pesquisa intitulada “Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em banco de leite humano”, que busca o efeito da pasteurização sobre o leite humano. O leite utilizado para análise será o que você doou e que não atingiu um volume necessário para a pasteurização.

Seu nome não irá aparecer na pesquisa, ou seja, seu anonimato será respeitado, e você terá o direito de, após a doação, ou durante a fase de análise dos dados, se recusar a participar da mesma. A não participação ou abandono não acarretarão penalidades ao seu filho ou a sua pessoa. Não será utilizado nenhum dado que poderá identificá-la.

Sabendo dos direitos a mim reservados, descritos acima, eu _____ afirmo que fui devidamente esclarecida e concordo em participar desta pesquisa, assinando o termo de consentimento em 2 vias, sendo uma (1) para mim e outra para o pesquisador.

Limeira, 18 de maio de 2005.

Nome por extenso: _____

RG. _____

Assinatura _____

Tel. Para contato: 3442-1988

Reclamações: telefone Comitê de Ética – Santa Casa de Limeira – 3446-6122