

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS E DA SAUDE  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**CLAUDETE DE OLIVEIRA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO CRU E  
PASTEURIZADO EM BANCO DE LEITE HUMANO NA CIDADE DE SÃO  
CARLOS**

**SÃO CARLOS**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS E DA SAUDE  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**CLAUDETE DE OLIVEIRA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO CRU E  
PASTEURIZADO EM BANCO DE LEITE HUMANO NA CIDADE DE SÃO  
CARLOS**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Enfermagem da Universidade  
Federal de São Carlos, como um dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Saúde.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina  
Paiva de Sousa**

**SÃO CARLOS  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48q Oliveira, Claudete de  
Qualidade microbiológica do leite humano cru e  
pasteurizado em banco de leite humano na cidade  
de São Carlos / Claudete de Oliveira. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
96 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Leite humano. 2. Banco de leite. 3. Análise  
microbiológico. I. Título.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Enfermagem

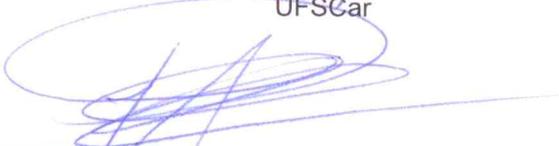
---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Claudete de Oliveira, realizada em 16/08/2016:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Juliana Cristina dos Santos Monteiro  
USP

Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos põe pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos, acrescentando a ele algo que fazemos.

Paulo Freire

## Dedicatória

Aos meus pais em memória, meus primeiros professores.

Aos meus filhos pelas lições de vida diariamente, pelo carinho, pela paciência e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus pela graça de ter me permitido concluir esse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de São Carlos, aos docentes e a coordenação de curso, pela oportunidade de possibilitar a minha formação ao longo desses anos de estudo.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Paiva de Sousa, meu muito obrigado pela preciosa orientação.

A minha banca de mestrado o Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Paulo Teixeira Lacava e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Cristina Monteiro, meus sinceros agradecimentos pela riqueza dos comentários e das orientações para que pudesse ser finalizado o presente estudo.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiane de Oliveira Sato pela orientação com as análises estatística, muito obrigada pela paciência e acolhimento.

As Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Helena Zem Mascarenhas; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Terezinha Protti; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monika Wernet; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jamile Castro Bussadori; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosely Morales de Figueiredo; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Priscilla Hortense; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giselle Dupas; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina C. Fabbro; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anamaria Alves Napoleão e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Isabel Bereta Ruiz, por todo carinho, acolhimento, palavras de conforto nos momentos mais difíceis, pelas orientações nessa longa caminhada, meus sinceros agradecimentos.

Ao Banco de Leite Humano da Santa Casa de São Carlos através de seu coordenador Dr.<sup>o</sup> André Giusti, a Responsável Técnica Enfermeira Annie Jiupato Corrêa, e a Técnica de Enfermagem Márcia e a todos que direta ou indiretamente puderam contribuir com esta pesquisa.

Ao Tiago Correa secretário do Programa de Pós Graduação Enfermagem /UFSCar, no auxílio com burocrático e acadêmico, ao Paulo Andrade no auxílio dentro do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB no Departamento de Morfologia e Patologia e aos colegas de bancada de laboratório, muito obrigado a todos.

Aos meus queridos amigos Rodolfo (DGero) Rose e Valdir (Denf) Beto e Cidinha (DMP), pelo carinho, pelo incentivo nos momentos em que me senti insegura e me ensinaram a superar meus medos e limites, meu muito obrigado a todos.

## RESUMO

O Leite Humano é considerado o alimento mais completo para o recém-nascido, para promover a coleta e distribuição com qualidade certificada, o Ministério da Saúde no cenário das políticas públicas promove o aleitamento materno e expansão da Rede Brasileira de Banco de Leite Humano o qual foi criado para garantir a certificação e a qualidade do Leite Humano Ordenhado, desde a coleta até a distribuição, sendo sua responsabilidade a seleção, avaliação físico-química e microbiológica, fornecendo um produto inócuo e respeitando sua função como alimento. Para contribuir com as evidências científicas o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de amostras de leite humano proveniente de Banco de Leite no município de São Carlos/SP, por intermédio de análise e da quantificação em placas de petri por meio de cultura sólida dos microrganismos mesófilos, psicrófilos, termófilos, *Staphylococcus* spp. fungos filamentosos e leveduriformes e número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes por meio de teste presuntivo e confirmativo, além da verificação do parâmetro físico químico do pH, acidez ° Dornic e do teor energético (K) correlacionando as variáveis na qualidade microbiológica por meio de análise estatística descritiva e a correlação linear Pearson. Das 29 amostras analisadas e impróprias para consumo, evidenciou a presença de 17,24% de psicrófilos, 27,59% de termófilos, 55,17% de mesófilos, 41,38% de fungos filamentosos leveduriformes e ausência de *Staphylococcus* spp, para o grupo de coliformes houve a presença de 82,76% fase presuntiva e 54,16% para coliformes totais e 33,33% para coliformes termotolerantes na fase confirmativa, os valores de pH e K não apresentaram variação, já para acidez houve o crescimento microbiano entre 3° a 15° Dornic, não foi detectada a correlação das variáveis físico-química. Os resultados apresentados nas análises sugerem que o houve deficiência nas boas práticas de manipulação, prejudicando a qualidade microbiológica de leite humano.

**Palavra chave:** Leite Humano, Banco de Leite, Análise Microbiológico.

## ABSTRACT

The Human Milk is considered the most complete food for the newborn, to promote the collection and distribution with certified quality, the Ministry of Health in the public policy scenario promotes breastfeeding and expansion of the Brazilian Network of Human Milk Bank which was created to ensure certification and the quality of human milk from collection to distribution, it is responsible for the selection, physicochemical and microbiological evaluation, providing an innocuous product and respecting their role as food. To contribute to the scientific evidence this study was to evaluate the microbiological quality of samples of human milk from milk bank in São Carlos / SP, through analysis and quantification in petri dishes by solid culture of mesophilic, psychophilic, thermophilic, *Staphylococcus* spp. filamentous fungi and leveduriform and most probable number (MPN) of total and fecal coliforms through presumptive test and confirmatory, as well as verification of physical-chemical parameters of pH, acidity ° Dornic and energy content (K) correlating the variables in the microbiological quality by descriptive statistical analysis and linear correlation Pearson. Of the 29 analyzed samples and unfit for consumption, revealed the presence of 17.24% of psychophilic, 27.59% of thermophiles, 55.17% of mesophilic, 41.38% of filamentous fungi and leveduriform absence of *Staphylococcus* spp, for coliform group was the presence of 82.76% presumptive phase and 54.16% for total coliforms and 33.33% for fecal coliforms in the confirmatory phase, pH values and K showed no variation, as for acidity was microbial growth between 3 ° to 15 ° Dornic, the correlation of physical and chemical variables was detected. The results presented in analyzes suggest that was deficient in good manufacturing practices, impairing the microbiological quality of human milk.

**Keyword:** Human Milk, Milk Bank, Microbiological Analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b>	MODELO ORGANIZACIONAL DA REDE BLH-BR	29
<b>FIGURA 02</b>	FLUXOGRAMA DE FUNCIONAMENTO DO BLH – CONTROLE DE QUALIDADE DO LHO	33
<b>FIGURA 03</b>	RECIPIENTE ISOTÉRMICO DE TERMÔMETRO	49
<b>FIGURA 04</b>	IMAGEM DO PHMETRO	50
<b>FIGURA 05</b>	ESQUEMATIZAÇÃO DA DILUIÇÃO EM PLACA DE PETRI COM MEIO SÓLIDO COM O LEITE HUMANO	52
<b>FIGURA 06</b>	ESQUEMATIZAÇÃO NMP DE COLIFORMES SÉRIE DE 3 TUBOS	54
<b>FIGURA 07</b>	PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICA DO VALOR ENERGÉTICO (K) DO LEITE HUMANO	56
<b>FIGURA 08</b>	PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICA DO VALOR DE pH DO LEITE HUMANO	58
<b>FIGURA 09</b>	PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICA DO VALOR DA ACIDEZ ° DORNIC DO LEITE HUMANO	60
<b>FIGURA 10</b>	CORRELAÇÃO LINEAR DA ACIDEZ ° DORNIC E MESÓFILOS	76
<b>FIGURA 11</b>	CORRELAÇÃO LINEAR DA ACIDEZ ° DORNIC E (K)	78
<b>FIGURA 12</b>	CORRELAÇÃO LINEAR DA ACIDEZ ° DORNIC E pH	78

## LISTA DE QUADRO

<b>QUADRO 01</b>	BENEFÍCIOS IMUNOLÓGICOS DO LEITE HUMANO	21
<b>QUADRO 02</b>	CLASSIFICAÇÃO DO LEITE HUMANO CONFORME PERÍODO DE LACTAÇÃO	22

## LISTA DE TABELA

<b>TABELA 01</b>	NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)/ML.	96
<b>TABELA 02</b>	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DO GRUPO MICROBIANO.	97
<b>TABELA 03</b>	DISTRIBUIÇÃO DO TEOR ENERGETICO (K)	57
<b>TABELA 04</b>	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA COM O VALOR DE PH, A FREQUÊNCIA E PERCENTUAL.	59
<b>TABELA 05</b>	DISTRIBUIÇÃO DA ACIDEZ ° DORNIC	62
<b>TABELA 06</b>	CONTIGÊNCIA AMOSTRAL RELACIONADA À PRESENÇA/AUSÊNCIA DE MICRORGANISMO EM RELAÇÃO À ACIDEZ $\leq 8^\circ$ DORNIC	63
<b>TABELA 07</b>	CONTIGÊNCIA AMOSTRAL RELACIONADA À PRESENÇA/AUSÊNCIA DE MICRORGANISMO EM RELAÇÃO À ACIDEZ $\geq 8^\circ$ DORNIC	64
<b>TABELA 08</b>	DISTRIBUIÇÃO DA FREQUENCIA DAS AMOSTRAS ANALISADAS COM A ACIDEZ ° DORNIC E O GRUPO MESÓFILOS	66
<b>TABELA 09</b>	QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES NA FASE PRESUNTIVO E CONFIRMATIVO VB E EC COM A ACIDEZ ° DORNIC	69
<b>TABELA 10</b>	TESTE ALTERNATIVO UTILIZADO NO BANCO DE LEITE	70
<b>TABELA 11</b>	QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES NMP/ML EM AMOSTRAS DE LEITE HUMANO	70
<b>TABELA 12</b>	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE MICRORGANISMO EM AMOSTRA DE LEITE HUMANO	72
<b>TABELA 13</b>	CORRELAÇÃO ENTRE ACIDEZ° DORNIC E O MICRORGANISMO MESÓFILOS	76
<b>TABELA 14</b>	CORRELAÇÃO ENTRE ACIDEZ° DORNIC E O Ph, K DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AM</b>	ALEITAMENTO MATERNO
<b>BLH</b>	BANCO DE LEITE HUMANO
<b>FIOCRUZ</b>	FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ
<b>IFF</b>	INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA
<b>LH</b>	LEITE HUMANO
<b>LHO</b>	LEITE HUMANO ORDENADO
<b>LHOC</b>	LEITE HUMANO ORDENADO CRU
<b>LHOP</b>	LEITE HUMANO ORDENADO PASTEURIZADO
<b>LM</b>	LEITE MATERNO
<b>MS</b>	MINISTÉRIO DA SAÚDE
<b>OMS</b>	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
<b>PCLH</b>	POSTO DE COLETA DE LEITE HUMANO
<b>RBBLH</b>	REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO
<b>RN</b>	RECÉM-NASCIDO
<b>RT</b>	RESPONSÁVEL TÉCNICO

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral .....	19
3.2 Objetivos Específicos .....	19
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4.1 Leite Humano.....	20
4.2 História do Banco de Leite Humano.....	23
4.3 Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano.....	28
4.4 Estrutura e Organização de um Banco de Leite.....	30
4.5 Referencial da seleção e classificação do Leite Humano .....	33
4.5.1 Seleção primária ou pré-estocagem .....	33
4.5.2 Embalagem e Rótulo .....	33
4.5.3 Verificação de sujidades .....	35
4.5.4 Verificação da cor .....	35
4.5.5 Verificação do <i>off-flavor</i> .....	36
4.5.6 Determinação da Acidez ° Dornic .....	37
4.5.7 Crematócrito .....	38
4.5.8 Pasteurização .....	39
4.5.9 A qualidade microbiológica do Leite Humano Ordenhado .....	39
4.6 Microrganismos Indicadores da Qualidade do Leite Humano .....	40
4.6.1 Coliformes.....	42
4.6.2 Bactérias Heterotróficas.....	42
4.6.3 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	44
4.6.4 Fungos filamentosos e leveduriformes .....	45
4.6.5 Tipo de Pesquisa .....	46
5. MATERIAIS E METODOS .....	48
5.1 Aspecto Ético .....	48
5.2 Ambiente experimental .....	48
5.3 Aferição do parâmetro físico-químico (pH) do Leite Humano.....	50

5.4 Preparo do meio para cultura de microrganismos e diluição seriada das amostras para microrganismos heterotróficos .....	50
5.5 Número mais Provável (NMP) de Coliformes totais/termotolerantes .....	52
5.6 Análise de Dados .....	54
6. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	55
6.1 Parâmetros físico/químicos do leite humano ordenhado pasteurizado ...	55
6.1.1 Teor Energético (K).....	55
6.1.2 pH .....	58
6.1.3 Acidez Dornic.....	60
6.2 Análises microbiológicas .....	68
7. CONSIDERAÇÕES .....	80
8. CONCLUSÃO .....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
ANEXOS .....	92
ANEXO 01 – Folha de Aprovação da Comissão de Ética (duas folhas). .....	92
ANEXO 02 - Parecer da Santa Casa de São Carlos com Aprovação do Projeto de Pesquisa. ....	94
APÊNDICES.....	95
APÊNDICE 01 - Tabela 1 – Número Mais Provável (NMP)/ml. ....	95
APÊNDICE 02 – Análise físico-química e quantificação do grupo microbiano.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde define o leite humano como o alimento mais completo para a criança, desde o nascimento até os primeiros 06 meses de vida, devendo ser fornecido até os dois anos de idade (WHO, 2003). Do ponto de vista biológico e psicossocial, o aleitamento materno oferece benefícios tanto para o crescimento e desenvolvimento de lactentes, como para a mãe (BRASIL, 2001).

O Leite Humano (LH) é o alimento mais adequado ao Recém-Nascido (RN) devido seu valor nutricional, fisiológico e propriedades imunológicas. O LH é uma fonte de inúmeras substâncias que conferem ao RN uma proteção altamente eficaz contra a atuação microbiana, exercendo ação local e/ou sistêmica (NETO, 2006). O fato de muitas vezes a criança estar impossibilitado de receber o LH pelo aleitamento natural motivou a criação do Banco de Leite Humano (BLH) para suprir esta necessidade (GIUGLIANI, 2002).

O primeiro BLH do Brasil foi implantado em outubro de 1943, no então Instituto Nacional de Puericultura, atualmente Instituto Fernandes Figueira (IFF). O seu principal objetivo era coletar e distribuir LH visando atender os casos considerados especiais, a exemplo da prematuridade, perturbações nutricionais e alergias a proteínas hierológicas (MAIA et al., 2006). Com essa mesma perspectiva, a partir do desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno, em 1985, o BLH passa a assumir um novo papel no cenário da saúde pública brasileira, transformando-se em elementos estratégicos para as ações de promoção, proteção e apoio à amamentação segundo Maia et al (2006) e portanto de promoção à saúde da criança.

O BLH do país faz parte da Rede Brasileira de Banco de Leite (RBBLH), a rede foi uma iniciativa do Ministério da Saúde (MS) e da

Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), funcionando desde 1943 e mantém suas atividades em todo o país (BRASIL, 2008). A RBBLH é a maior e a mais complexa do mundo (GIUGLIANI, 2002). Composta por 217 bancos e 163 postos de coletas, os BLH no exercício de 2015 coletaram 178.768,7 e distribuíram 139.074,9 litros de LH com qualidade certificada, a 167.196 receptores, o que envolveu a participação de 171.138 mães que integram voluntariamente o programa de doação. Além disso, neste mesmo período, foram atendidas 1599.382 gestantes e nutrizes que recorrem aos BLH em busca de apoio para amamentar (REDEBLH, 2016).

O BLH é um centro especializado, obrigatoriamente vinculado ao hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do LH, para posteriormente ser distribuído sobre a prescrição médica ou de um nutricionista (ANVISA, 2005), leite este ordenado de doadoras voluntárias cadastradas no programa que visa à melhoria da qualidade de vida dos recém-nascidos e, conseqüentemente, diminuindo os índices de mortalidade infantil (NOVAK, et al., 2002).

Uma das prioridades dos BLH no Brasil é a de atender às mães de Recém-nascido (RN) de pré-termo e de baixo peso internados em unidades hospitalares segundo Giugliani (2002). O sistema imunológico e o aparelho gastrointestinal do RN adaptam-se logo após o nascimento à vida extrauterina (CARVALHO e TAMEZ, 2005). O RN possui maior susceptibilidade a infecções, sendo que os mais desfavorecidos imunologicamente são prematuros e de baixo peso, pois recebem menos imunoglobulinas e principalmente a IgG materna por transferência placentária e tem um maior retardo na maturação do sistema imune e aparelho intestinal (CARVALHO e TAMEZ, 2005).

Neto (2006) afirma que o crescimento e a maturação do epitélio intestinal têm um efeito imunomodelador, contribuindo para a maturação e desenvolvimento do sistema imunitário. Essa adaptação é um processo de maturação dependente da exposição a antígenos e modulação do sistema

imune, o qual o LH tem importante função neste processo (CARVALHO e TAMEZ, 2005).

O BLH presta serviços também ao RN prematuros ou de baixo peso, internado em Unidade Terapia Neonatal, com comprometimento imunológico, perturbação gástrica ou que são alérgicos a outros tipos de leite (SCARSO, 2008). O RN prematuro possui maior necessidade de LH proveniente do BLH em virtude de sua prematuridade do reflexo de sucção e deglutição, sendo que não dispõe de forças para sugar o leite materno segundo Carvalho e Tamez (2005), pois o ato de amamentar causa gasto de energia, resultando na perda de calorias. O BLH também beneficia o RN, onde a amamentação não é indicada, a exemplo o RN portador de patologias respiratórias; cardíacas; gastrointestinais; entre outras (SERAFINI et al., 2003).

Portando o LH preenche perfeitamente as demandas nutricionais, imunológicas e afetivas do RN (SERAFINI et al., 2003). Entre estes e outros motivos, muitos lactentes são alimentados com LH obtido em BLH, produto de doações voluntárias de mulheres que têm produção excedente e para que haja garantia da qualidade do LH cedido o mesmo deve ser proveniente de BLH (COSTA; SOUZA; SANTOS FILHO, 2004). Já que as evidências científicas comprovaram a eficácia e segurança da pasteurização do LH como processo de inativação de 95% de agentes patogênicos segundo Novak et al., (2002).

O LH possui uma composição rica em diversos nutrientes, tornando-o um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos, já que o mesmo é um alimento que não dispõem de nenhum tipo de barreira física que sirva de obstáculo à penetração de microrganismos contaminantes (NOVAK, FR. et al, 2008).

O LH obtido de doadoras saudáveis, submetidas a rigoroso controle de higiene, deve estar isento de microrganismos patogênicos, estes, quando ocorrem, encontram-se vinculados a fontes de contaminação externas (NOVAK, ALMEIDA, SANTOS, WANKE, 2002; SOUZA 2008), o LHO nos

domicílios em más condições higiênicas do local de coleta pode contaminar o produto (NOVAK, ALMEIDA, SANTOS, WANKE, 2002). A presença de contaminantes em níveis elevados no Leite Humano Ordenhado Cru (LHOC) possibilita a redução do valor biológico pela utilização de nutrientes do leite pela microbiota contaminante e a diminuição dos fatores de defesa (ALMEIDA, 1986).

A qualidade microbiológica do LHO distribuído a favor do BLH é um assunto de interesse para a saúde pública, sendo o controle do LH um desafio ao BLH, pois o consumo de LH contaminado pode ocorrer complicações no RN, a presença de contaminantes no LH inviabiliza o produto e desclassifica o produto para o consumo, inativando assim o processo de pasteurização que se torna ineficaz, quanto mais elevada a carga microbiana no produto, maior será a preocupação em relação a presença de microrganismo patogênicos, o qual incide sobre a ocorrência de cepas produtoras tóxicas resistente à pasteurização e a vulnerabilidade do RN (SERAFINI et al., 2003).

Frente ao exposto e na perspectiva de promoção da saúde do recém-nascido de pré-termo ou baixo peso, a literatura é unânime demonstrando que o aleitamento materno é considerado elemento fundamental na prevenção de infecção e diminuição da mortalidade infantil. Partindo desse pressuposto, ficam diversas indagações, dentre as quais explicitamos algumas: Como é realizado o controle de qualidade microbiológica do Leite Humano Ordenhado? Existe risco contaminação cruzada implicada na veiculação de microrganismos patogênicos?

Contribuindo com evidências científicas no âmbito do Aleitamento Materno, o presente trabalho concebe como propósito de estudo à abordagem da Incidência Microbiológica na Qualidade do Leite Humano Ordenhado sob a questão problema; “Quais as condições do Leite Humano Ordenhado no Banco de Leite da cidade de São Carlos”?

## 2. JUSTIFICATIVA

A análise microbiológica do Leite Humano Ordenhado (LHO) propõe verificar e quantificar os microrganismos que se encontram presente no Leite Humano (LH), sendo assim fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi coletado, manipulado, armazenado em rede frio e os riscos que pode oferecer a saúde segundo Franco; Landgraf, (1996), vista que a presença sujidades e a elevação da acidez do leite são resultantes de más práticas de manipulação do produto e representa o descarte do LH durante a análise inicial (MITSUE, 2010), além disso, o LH é um excelente meio de cultura e não dispõe de obstáculo para a comunidade microbiana.

Tendo em vista os benefícios LH os Bancos de Leite Humano (BLH) possui a responsabilidade de garantir a qualidade do LHO desde a coleta até a distribuição, etapas que envolvem procedimentos com riscos de contaminação e, portanto, necessitam ser criteriosamente controlados (BRASIL, 2006; BRITTO; BARBOSA; MERCHÁN-HAMANN, 2002). É de comprometimento dos BLH o fornecimento LHO invulnerável, inócuo e que cumpra a sua função como alimento, promovendo e mantendo a saúde de recém-nascido, pois a pasteurização inativa 95% dos agentes patogênicos.

A qualidade do LHO em BLH é circunscrita pelo controle de inspeção em teste físico-química e microbiológica até a liberação do produto final, sendo que as condições higiênicas sanitárias é o parâmetro aceito para viabilizar a qualidade microbiológica do LH, portanto o grupo de coliformes é o mais utilizado como indicador de condições higiênico sanitário do LHO em BLH, devido ao baixo custo operacional e ao grande quantidade de volume de LH. A saúde do recém-nascido é de suma importância para a saúde materno infantil e as boas práticas no processo de manipulação de LHO constituem procedimentos necessários para garantir a sua qualidade, a presente pesquisa justifica-se pela relevância do LHO e qualidade microbiológica diante da vulnerabilidade da clientela receptora.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a qualidade microbiológica de amostras de leite provenientes do Banco de Leite Humano no município de São Carlos/SP.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar e analisar a microbiota de amostras de leite humano ordenhado cru e pasteurizado por meio das seguintes análises:
  - Quantificação de microrganismos heterotróficos (mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis), psicrófilos e termófilos por variação da temperatura;
  - Quantificação de *Staphylococcus* spp. e os testes de catalase e coagulase;
  - Quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduriformes;
  - NMP de coliformes totais e termotolerantes;
  
- Verificar parâmetro físico-químico do Leite Humano inferindo e correlacionado estes parâmetros com as variáveis da quantificação microbiológica.
  - Potencial hidrogeniônico (pH);
  - Acidez ° Dornic;
  - Teor energético (K).

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Leite Humano

A amamentação oferece inúmeros benefícios para a saúde da criança, pois o leite materno fornece os nutrientes e imunológicos necessários para a criança e supre as necessidades do lactente até o sexto mês de vida (PASSANHA, 2010) apud (VIEIRA et al 2004; BRASIL, 2002a). É um alimento capaz de oferecer ao bebê todos os ingredientes e a composição específica que se ajusta às necessidades nutricionais do lactente assim compatível com suas limitações metabólicas e fisiológicas (PASSANHA, 2010).

Composto por mais de 250 constituintes o LH é capaz de responder a peculiaridades e especificidades das necessidades dos recém-nascidos, incluindo os prematuros, que responder à imaturidade do trato gastrointestinal, à incapacidade na produção enzimática no bebê, seus nutrientes são absorvidos por terem a digestão facilitada pela presença de enzimas do próprio leite (SILVA, 2004).

O LH possui outros componentes que atuam na defesa do organismo do lactente, como imunoglobulinas, fatores anti-inflamatório e imune estimuladores, esses mecanismos incluem atividade específica contra agentes infecciosos, crescimento celular da mucosa intestinal aumentando a resistência às infecções, entre outros (PASSANHA, 2010) apud (LAMOUNIER et al, 2001; RIBEIRO et al, 2007). O LH diminui a incidência e/ou a gravidade de diarreia, botulismo, enterocolite necrotizante, alergias, doenças infecciosas e respiratórias, incluindo as autoimunes, como também estimula o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do recém-nascido (PASSANHA, 2010) apud (VIEIRA et al 2004). As solúveis incluem imunoglobulinas, IgA, IgM, IgD, IgE, IgG, com predominância da IgA, lisozima, lactoferrina, componentes do sistema de complemento (C3, C4), peptídeos bioativos, oligossacarídeos e lipídios (fator anti *Staphylococcus* e

inativação de vírus). Os componentes celulares imunologicamente ativos são constituídos por fagócitos polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos, nucleotídeos, plasmócitos e células epiteliais (PASSANHA, 2010) apud (LAMOUNIER et al, 2001; DEVINCENZI et al 2007; BRASIL, 2002a; JACKSON et al, 2006). Segue algumas propriedades anti-infecciosas do LH representadas através dos componentes solúveis e celulares expressa no Quadro 01.

<b>Quadro 1 – Benefícios Imunológicos do Leite Materno</b>	
<b>Componente</b>	<b>Ação células brancas do sangue</b>
Linfócitos B	Produzem anticorpos dirigidos contra microrganismos específicos.
Macrófagos	Eliminam imediatamente microrganismos do intestino do bebê, produzem a lisozima e ativa outros componentes do sistema imune.
Neutrófilos	Podem agir como fagócitos, ingerindo bactérias do sistema digestivo do bebê.
Linfócitos T	Eliminam células infectadas diretamente ou emitem mensagens químicas para mobilizar outros mecanismos de defesa. Ele prolifera na presença de organismos que causam doenças graves em crianças. Eles também fabricam substâncias que podem reforçar a resposta imune da própria criança.
<b>Componente</b>	<b>Ação Moléculas</b>
Anticorpos da classe IgA secretora	Ligam-se aos micróbios no digestivo do bebê e desta forma impedem secretora que eles passem através da parede do intestino para dentro dos tecidos do corpo.
Proteína que se liga à B12	Reduz a quantidade de vitamina B <sub>12</sub> que a bactéria necessita para crescer.
Fator bifidus	Promove o crescimento de Lactobacillus bifidus bactéria inofensiva, no intestino do bebê.
Ácidos graxos	Rompem as membranas que envolvem certos vírus e os destroem.
Fibronectina	Aumenta a atividade antimicrobiana dos macrófagos; ajuda-os a reparar tecidos que foram lesados por reações imunes no intestino do bebê.
Gama-interferon	Aumenta a atividade antimicrobiana das células imunológicas.
Hormônios e fatores de crescimento	Estimulam a maturação mais rápida do trato digestivo do bebê. Quando as membranas de revestimento do intestino, inicialmente "porosas", amadurecem, a criança torna-se menos vulnerável aos microrganismos.
Lactoferrina	Muitas bactérias necessitam se ligar ao ferro para sobreviver. Por reduzir a quantidade de ferro disponível, a lactoferrina frustra o crescimento de bactérias patogênicas.
Lisozima	Elimina bactérias rompendo suas paredes celulares.
Mucina	Adere a vírus e bactérias, impedindo tais microrganismos de se ligarem a superfícies mucosas.
Oligossacárides	Liga aos microrganismos e os impede de se ligarem a superfícies mucosas.

Fonte: NEWMAN, 1995, adaptado.

Por ser um alimento não estruturado o LH, não possui proteção física que impeça o acesso da microbiota aos seus nutrientes, tornando-se um excelente meio de cultura para diversos microrganismos (NOVAK et al., 2002; BRASIL, 2008) quando obtido de doadoras saudáveis e sob controle rigoroso de higiene, é livre de microrganismos patogênicos, quando há identificação, é devida a fontes de contaminação externa (NOVAK et al., 2002).

Por ser um produto lábil, a coleta de leite e sua conservação precisa ser rigorosamente controladas para a manutenção de sua qualidade, pois o leite se altera facilmente com o calor e a proliferação de microrganismos, especialmente em presença daqueles que degradam a lactose com produção de ácidos (RONA, 2008; ALMEIDA, 1999).

De acordo com as definições de Almeida, (1999), o LH classifica-se de acordo com o período de lactação; colostro, leite humano de transição e leite humano maduro, para determinar a classificação, é considerada a informação prestada pela paciente em seu cadastro de doadora, considerando a idade gestacional no momento do parto e a idade da lactação em dias em que o leite foi coletado, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Classificação do Leite Humano conforme o período de Lactação	
<b>Classificação</b>	<b>Período</b>
Colostro	Menos de sete dias após o parto
Leite de Transição	Sete a 14 dias após o parto
Leite Maduro	Mais de 14 dias após o parto
Leite de Mãe de Prematuro	Idade gestacional inferior a 37 semanas

Fonte: Almeida, 1999.

## 4.2 História do Banco de Leite Humano

Banco de Leite Humano (BLH) é um serviço especializado vinculado ao hospital, voltado à atenção materna e/ou infantil. Sendo responsável pela promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, assim como pela execução de atividades de coleta de excedente da produção láctea da nutriz, por meio do processamento, controle de qualidade e distribuição do leite coletado (BRASIL, 2008). O BLH foi criado com o objetivo de coletar e distribuir Leite humano (LH) para atender os casos considerados especiais, como prematuridade, perturbações nutricionais e alergia a proteínas heterólogas (ALMEIDA, 1999; BORGIO et al., 2005). Não visam lucro, sendo vedada a comercialização de seus produtos (BRASIL, 2006).

As menções no início da década de quarenta e esforços de organização para o primeiro BLH implantado no Brasil, o qual tinha como objetivos coletar e distribuir Leite Humano (LH), localizado no Instituto Nacional de Puericultura, que mais tarde viria a se transformar no atual Instituto Fernandes Figueira (IFF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), era considerado um receptor formal de LH para bebês prematuros, crianças com carências nutricionais importantes, ou ainda os que apresentassem intolerância ao Leite Artificial (LA). Entretanto, segundo Almeida et al., (2004), os BLH também surgiram como resposta às falhas do paradigma do desmame comerciogênico, que havia substituído as tradicionais amas-de-leite.

Maia et al., (2006) descreve em seus estudos que implantação de BLH do país em 1943 que este foi originalmente projetada para atender casos especiais, em que o LH era considerado imprescindível, muito mais por suas propriedades farmacológicas do que por suas qualidades nutricionais, característica também observado em seus estudos por Almeida, (1999) o qual refere-se que o LH destinava-se tão somente às situações de emergência que não podiam ser solucionadas com a alimentação artificial, que era colocada como primeira alternativa. Durante décadas a concepção de funcionamento do BLH tinha idealmente a intenção de ser um órgão de

proteção social, de preservar e garantir os interesses da doadora e de seu filho, sem a expectativa de lucro, porém o mesmo estimulava a prática de amamentação natural através de recompensa à nutriz pelo leite doado, conforme Maia et al, (2006).

Na realidade, os BLH operavam basicamente nos processos de coleta e distribuição, relegando as ações de estímulo à amamentação a um plano secundário Maia et al., (2006). É importante entender a distância existente entre a intenção expressa na definição do modelo do BLH e o que ele próprio possibilitou na prática, pois para tanto, praticavam estratégias muitas vezes questionáveis.

A desfavorável realidade socioeconômica das doadoras contribuía para a comercialização do LH que, para elas, se apresenta como forma de complementação de seu sustento e da família, com essa prática contribuem para estimular a gravidez segundo Maia et al., (2006). Alguns BLH chegaram a profissionalizar a doação renumerando a nutriz de acordo com o volume produzido, outros se valiam de atrativos, tais como assistência médica diferenciada e distribuição de cesta de alimentos (ALMEIDA, 1992) apud (BRASIL, 2008), a doação não resultava de um processo voluntário e consciente, como nos dias atuais, que depende exclusivamente da solidariedade humana. Sendo que o LH era distribuído preferencialmente na forma de produto cru, sem receber qualquer tipo de tratamento (BRASIL, 2008), entretanto, em decorrência de grande volume de LH coletado, fez-se necessário introduzir o tratamento térmico, que era conduzido em equipamento de esterilização de mamadeiras, em banho-maria por 20 minutos (ALMEIDA et al., 1994).

Almeida et al., (1994) contextualiza que o programa de estímulo à doação de LH era orientado para a população de baixa renda, as quais são levadas a vender o leite produzido, ocasionando o detrimento da saúde do seu filho, e como relevância de o fato o acontecimento era patrocinado pelo serviço de saúde materno-infantil, o qual é voltado para a promoção do bem estar físico e mental da mulher e da criança, através de seus profissionais

graduados médicos e enfermeiras diplomadas, que promoviam as condições necessária de estímulo à doação e orientações como: guardar um peito para doação ou deixar o bebe mamar só o leite de inicio eram informações repassadas com frequências. “Chama a atenção o fato de muitas mulheres terem sido orientadas a assumir práticas comuns à pecuária leiteira, em que o mais importante papel a ser cumprido pela cria é o de funcionar como elemento indutor da lactação” (ALMEIDA et al., 1994).

Ao término da década de 70, medidas para promover a saúde e nutrição de lactentes e crianças na primeira infância foram estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). Entre elas, a recomendação a todo sistema de saúde para que assegure a orientação a todas as mães de modo a garantir “[...] a manutenção da amamentação pelo maior tempo possível e que todos os procedimentos obstétricos e de assistência pré-natal deveriam ser compatíveis com a política de promoção e apoio ao aleitamento materno” (VIECZOREK, 2010) apud (LIMA; OSÓRIO, 2003, p. 306).

Com o desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM) este movimento desencadeou uma valorização da pratica da amamentação na sociedade brasileira a partir do inicio da década dos anos 80 (ALMEIDA et al., 1999). Além dos aspectos nutricionais e imunológicos que beneficiam a criança, as vantagens do aleitamento para mãe, família, sociedade e estado foram trazidos a relevo e transformadas em instrumento em favor da amamentação (SOUZA, 2003).

Para Almeida et al., (1994) a superioridade do aleitamento materno transformou em unanimidade no meio científico sendo amplamente divulgado para o público em geral através de campanhas nos meios de comunicação, em geral a clínica pediatria, e concebeu as vantagens da amamentação e, inovou rigorosamente o conhecimento do método, no intuito de compatibilizar as peculiaridades fisiológicas do metabolismo do lactente com as descobertas acerca das propriedades biológicas impar de leite humano. Havendo assim mudanças nas práticas hospitalares,

treinamento e supervisão das equipes de saúde, impulsionado os profissionais e funcionários de maternidades e hospitais com rotinas para prevenir o desmame precoce (LIMA; OSÓRIO, 2003).

Outras ações surgiram no cenário das políticas públicas para apoiar e promover o Aleitamento Materno (AM), como, por exemplo, a implementação do Programa Iniciativa Hospital Amigo da Criança, em 1992, e a expansão da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, inaugurada em 1998 (RAUPP et al., 2011). Esse pensamento predominante foi o fator determinante na implantação de novos bancos de leite até metade dos anos 80 e, nesse período, verificou-se modesto aumento numérico de unidades, que a partir de 1985, verifica-se maior rapidez no surgimento de BLH, sendo que no intervalo de seis anos (1985 a 1990), foram instalados 47 e a década seguinte, esse número transpassou a cem unidades (MAIA et al., 2004).

Diante dessa mudança de pensamento, a missão dos bancos de leite humano rompeu com o antigo paradigma, e passou à condição de unidade de serviço de saúde, visando promover, proteger e apoiar o aleitamento materno, coletar e distribuir leite humano com qualidade certificada e contribuir para a diminuição da mortalidade infantil (RAUPP et al., 2011).

Com o surgimento desse paradigma e a nova formulação de atuação dos BLH, sendo que este foi fortemente influenciado pela atuação de profissionais altamente qualificados, cujo grupo se organizou através da diferenciação e ampliação do espaço de atuação tradicional dos BLH, esse avanço através de atividade acadêmica e permanente qualificação de recursos humanos de nível médio, superior e de pós-graduação *stricto sensu* e também por atividades de investigação científica e de desenvolvimento tecnológico passaram a fazer a sustentação acadêmica para o novo projeto que então se iniciava. Dentro dessa ampliação inicia uma nova articulação com o campo da saúde coletiva bem como novo espaço de atuação na própria formulação da Política Nacional de Aleitamento Materno, dessa

forma, foi sedimentado o caminho para sustentação de um novo modelo de gestão e de atuação dos BLH (MAIA et al., 2004).

Em 1998, a FIOCRUZ, através do BLH do IFF, passou a coordenar a elaboração e implantação do projeto REDEBLH cujo objetivo pode assim ser descrito: nortear a formulação, implementação e acompanhamento da política estatal no âmbito de atuação dos BLH em todo o território brasileiro (MAIA et al, 2004). Essa articulação com o Ministério da Saúde (MS) havia projeções para ampliação gradual da rede, tendo como objetivo a atuação interativa e compartilhada de todas as unidades participantes.

A partir de então, houve um importante crescimento qualitativo dos BLH, associado a uma atuação cada vez mais diferenciada e a rede de BLH foi criada com sucesso. Crescem os investimentos em pesquisa permitindo que o BLH do IFF, agora Centro de Referência Nacional, desenvolvessem métodos de controle de qualidade tipicamente adaptados às necessidades nacionais, que eram seguros e sensíveis o suficiente para serem praticados na rotina (MAIA et al., 2004).

Essa prática possibilitou enfrentar, com segurança, possíveis agravos e riscos decorrentes do surgimento da AIDS, o custo de análise por amostra diminuiu, e as técnicas de processamento foram adaptadas a modelos de alta confiabilidade e também de baixo custo. Por essa razão, enquanto, em várias regiões do mundo, bancos de leite foram fechados por temor às questões de segurança operacional e risco biológico, o Brasil viveu um franco processo de expansão (MAIA et al., 2004).

A Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (REDEBLH), forma um conjunto de instituições que atuam, direta ou indiretamente, nas ações de promoção do aleitamento materno, coleta, processamento, controle de qualidade e distribuição de leite humano ordenhado pasteurizado, seu funcionamento é de forma autônoma e sem hierarquia organizacional formalmente estabelecida, sendo fundamental o compromisso social, cooperação técnica, geração e apropriação do conhecimento são elementos inerentes à realização das ações desenvolvidas evidenciando a busca de

processo contínuo de inovação tecnológica (MAIA et al., 2004) apud (ALMEIDA, 2001).

A estruturação da REDEBLH complementa-se com as referências regionais ou estaduais formalizadas através de convênios de cooperação firmados entre a FIOCRUZ e as Secretarias Estaduais de Saúde, sendo dessa forma que se estabeleceram as articulações e criaram-se os mecanismos de interlocução e cooperação técnico-científica do BLH e participantes da rede (MAIA et al., 2004).

### **4.3 Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano**

A Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RBBLH) foi criada em 1998, por iniciativa conjunta do Ministério da Saúde e Fundação Oswaldo Cruz (REDEBLH, 2016) construída de forma progressiva, e, por meio da ação coordenada de pesquisa e do desenvolvimento tecnológico que desenvolveu metodologias alternativas, com baixo custo operacional, voltadas ao processamento e ao controle de qualidade do leite humano (BRASIL, 2008).

A consolidação da RBLH-BR ocorre combinada com sua expansão, e resulta de um processo histórico caracterizando a busca da qualidade associando à experiência e conhecimentos acumulados pelo Banco de Leite do Instituto Fernandes Figueira, sendo que tem como objetivo o de nortear a formulação, implantação e acompanhamento da política estatal, no âmbito de atuação dos Bancos de Leite Humano no país, esse trabalho desenvolvido foi considerado uma iniciativa importante para redução dos custos na alimentação de recém-nascidos prematuros, assim como na promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno nos países com os quais a RBLH colabora (REDEBLH, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou o trabalho da RBBLH como o que mais contribuiu para a redução da mortalidade infantil e

para a promoção do aleitamento materno dentre todos os que foram desenvolvidos na década de 90 sendo que atualmente, o Brasil conta com a maior rede de bancos de leite humano do mundo, constituída por 217 unidades e 162 postos de coletas (REDEBLH, 2016). Sua missão é Promover a saúde da mulher e da criança mediante integração e a construção de parcerias com órgãos federais, as unidades da federação, municípios, iniciativa privada e a sociedade, no âmbito da atuação dos BLHs através de sua estrutura que é formada por Núcleo de Gestão e Informação; Núcleo SUS-RedeBLH-BR; Núcleo BLH-AL de Apoio a América Latina; Programa de Qualidade em BLH; Programa de Ensino, Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (REDEBLH, 2016) demonstrado na sua abaixo:



Figura 1 – Modelo de Organização da RBLH-BR  
 Fonte: Modelo de Atuação – (REDEBLH, 2016).

Para consecução dos objetivos da REDEBLH, o Centro de Referência Nacional, articula-se com cada Centro de Referência Estadual e suas respectivas comissões, sendo que as decisões são compartilhadas com as representações dos BLH localizadas em outros municípios (MAIA, 2006).

Nessas articulações da REDEBLH, a informação e o conhecimento tornam-se estratégicos, assim o Centro de Referência Nacional, sede da Rede, busca soluções para os problemas apontados em sua área de atuação, por tanto assim, as atividades acadêmicas desenvolvidas na sede da REDEBLH, busca construir o conhecimento eficiente, capaz de promover as transformações sociais necessárias à melhoria da qualidade da saúde (ALMEIDA, 2004). Nesse sentido, o compartilhamento de conhecimento, se tornou possível à geração de novos saberes e práticas, contribuindo para que REDEBLH além da promoção de transformações sociais a formulação de política pública voltada para área da saúde da mulher e da criança (MAIA, 2006).

#### **4.4 Estrutura e Organização de um Banco de Leite**

Como serviço especializado e vinculado ao hospital, o Banco de Leite Humano (BLH) está voltado à atenção materna e/ou infantil, sem fins lucrativos. Sendo que este é responsável pela promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, através da execução de atividades de coleta, do processamento, do controle de qualidade e distribuição do Leite Humano (LH) coletado, o qual é excedente de produção láctea da nutriz, (BRASIL, 2008). Com a missão incentivar à saúde da mulher por meio de trabalho conjunto as unidades federais no âmbito de atuação do BLH (FIOCRUZ, 2008). Vinculado tecnicamente o BLH, há o Posto de Coleta de Leite Humano (PCLH) que é uma unidade fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar do BLH. O PCLH é responsável por ações de promoção, proteção e de apoio ao aleitamento materno, com a execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz e sua estocagem, não podendo executar as

atividades de processamento de leite, que são exclusivas do BLH (FIOCRUZ, 2008) apud (BRASIL, 2001; BRASIL, 2006). Ambos o BLH e o PCLH, para funcionar, devem possuir licença sanitária atualizada, emitida pelo órgão de vigilância sanitária competente, observando as normas legais e regulamentares pertinentes (FIOCRUZ, 2008) apud (BRASIL, 1977; BRASIL, 2006).

O BLH e o PCLH devem possuir documentação com a descrição dos cargos, de funções de pessoal e da estrutura organizacional, além de definição de qualificação exigida e responsabilidades. A direção do serviço de saúde, a coordenação e o responsável técnico (RT) do BLH e/ou do PCLH devem planejar, implementar e garantir a qualidade dos processos, incluindo: os recursos humanos, materiais e equipamentos necessários para o desempenho de suas atribuições, em conformidade com a legislação vigente; a responsabilidade sobre o processo de trabalho; e supervisão do pessoal técnico durante o período de funcionamento (BRASIL, 2006).

A organização desse processo de trabalho em equipe, visualizada na cooperação integrada do usuário, constitui em tarefa diária de superação de desafios, objetivando a melhoria contínua da qualidade, sem fragmentação, possibilitando um melhor atendimento ao usuário e conferindo boas condições de trabalho à equipe (FIOCRUZ, 2008). A Portaria nº 322, de 26 de maio de 1988 foi o primeiro documento que aprovou normas gerais destinadas a regular a instalação e o funcionamento dos Bancos de Leite Humano (BLH), no Brasil. A partir de 05 de setembro de 2006, os BLH brasileiros passaram a ter um novo regulamento para funcionamento: Resolução RDC nº171, de 04 de setembro de 2006 (REDEBLH, 2016).

Devido à responsabilidade do BLH, em coletar, processar, e distribuir o LH, o mesmo deve seguir critérios estabelecidos pela Portaria nº 322 (BRASIL, 1988), sendo que o mesmo deve fornecer um LH seguro e inócuos, que respeite a sua função como alimento promovendo e mantendo a saúde, principalmente ao considera o grupo ao qual se destinam às crianças altamente vulneráveis (CASTRO, 2006) apud (REGO, 2002). “A

qualidade do leite humano ordenhado pode ser definida como uma grandeza que resulta da avaliação conjunta de uma série de parâmetros, que incluem as características nutricionais, imunológicas, químicas e microbiológicas” (VIECZOREK, 2010) apud (RONA, 2008). Para garantir a qualidade do processamento do leite coletado e distribuído, o Governo Federal criou, em 2003, o Programa Nacional de Controle de Qualidade em Banco de Leite Humano, com o objetivo de promover condições que permitem verificar a qualidade dos produtos e serviços sob a responsabilidade dos BLH em todo o país (VIECZOREK, 2010) apud (RONA, 2008; FIOCRUZ, 2008), conforme apresentado na figura 2 do fluxograma de funcionamento do banco de leite.

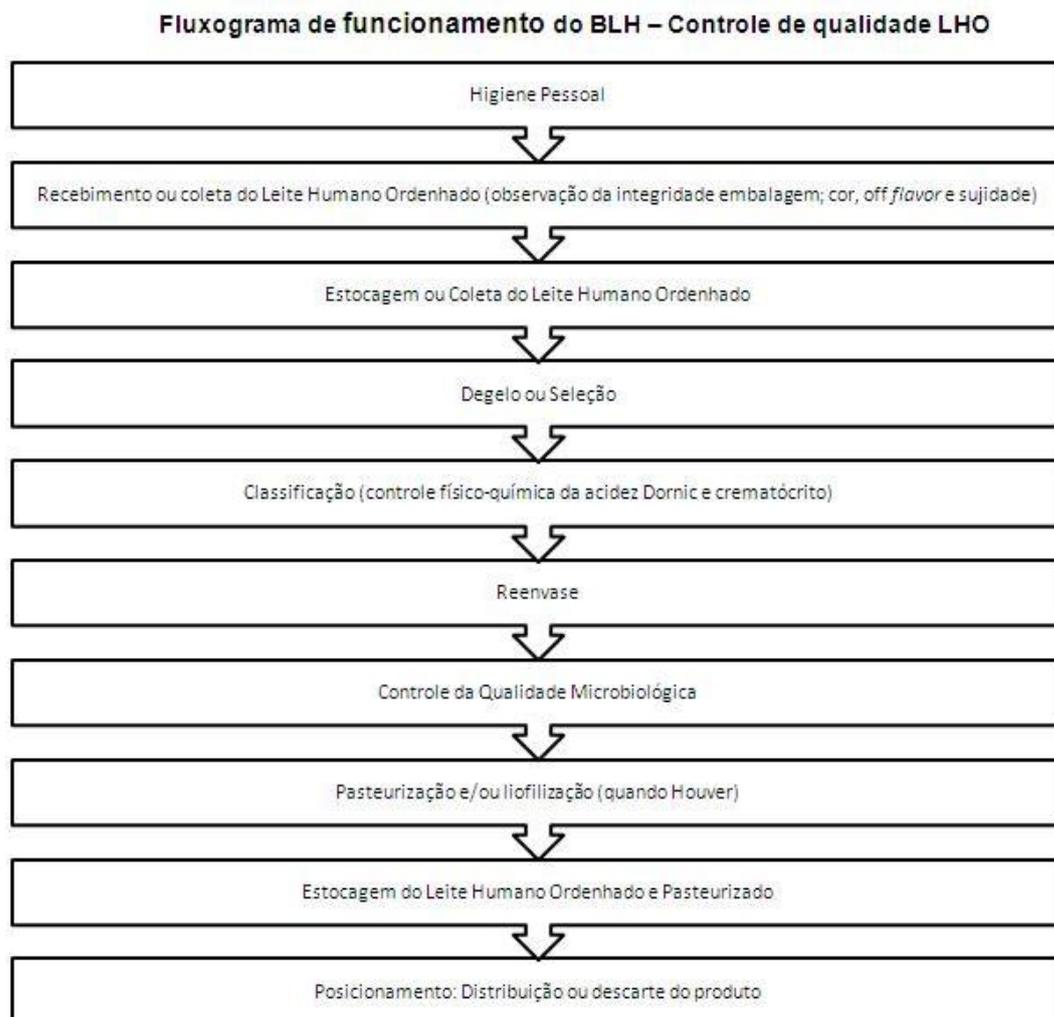


Figura 2 – Fluxograma de funcionamento do BLH – Controle de qualidade LHO  
Fonte: BRASIL, 2008

O LH para que mantenha as suas características física, química, biológica e assim certifique a sua qualidade e necessária para que cumpra a sua função de alimento, antes de ser distribuído são impostas algumas condições o qual o Leite Humano Ordenado (LHO) é submetido por um rigoroso processo de atividades. As quais são necessárias os cuidados em sua manipulação, pois o LH é um excelente meio de cultura para os microrganismos, devido a suas características intrínsecas, como a elevada percentagem de água; pH próximo ao neutro; e, riqueza de nutrientes (VIECZOREK, 2010) apud (FRANCO, LANDGRAFF, 2005). Brasil (2006) afirma que os produtos que não preencherem as especificações determinadas deverão ser descartados conforme disposto no RDC/ANVISA, nº306/2004, para resíduos do grupo D, ou seja, podem ser descartados diretamente na rede de esgoto (águas servidas), sem tratamento prévio.

#### **4.5 Referencial da seleção e classificação do Leite Humano**

##### **4.5.1 Seleção primária ou pré-estocagem**

O LH captado pelo BLH é submetido aos procedimentos de seleção que compreende as etapas das condições da embalagem, a presença de sujidades, a cor, *off-flavor* e acidez Dornic (FIOCRUZ, 2008). Após as etapas concluídas o BLH optar por estocar o produto, ainda cru, ou iniciar instantaneamente o processamento para o controle de qualidade microbiológico (BRASIL, 2006), sendo que os produtos que não preencherem as especificações determinadas deverão ser descartados conforme disposto no RDC/ANVISA, nº306/2004, para resíduos do grupo D, ou seja, podem ser descartados diretamente na rede de esgoto (águas servidas), sem tratamento prévio.

##### **4.5.2 Embalagem e Rótulo**

A embalagem destinada ao acondicionamento de leite humano ordenado deve ser de fácil limpeza e desinfecção, apresentar vedamento

perfeito, e ser constituída de matéria inerte e inócua ao leite em temperaturas na faixa de -25 °C (vinte e cinco graus Celsius negativos) a 128°C (cento e vinte e oito graus Celsius), não permitindo trocas indesejáveis com o produto acondicionado e mantendo seu valor biológico (BRASIL, 2006). É recipiente de vidro, estéril, com boca larga, tampa plástica rosqueável e com volume de 50 a 500 ml, previamente testado (FIOCRUZ, 2003). Devem ser descartadas as embalagens que apresentarem não conformidades como manchas, sujidades, rachaduras e trincas, entre outras, observando-se o prazo de validade da esterilização (BRASIL, 2008).

Os frascos com Leite Humano Ordenhado Cru (LHOC) e Leite Humano Ordenhado Pasteurizado (LHOP) devem ser obrigatoriamente rotulados, contendo informações que permitam a obtenção da história pregressa do leite, propiciando assim a rastreabilidade, sempre que necessário (BRASIL, 2001). Nos rótulos dos frascos destinados à coleta domiciliar, consta as seguintes informações: identificação da doadora, data e hora da primeira coleta.

Os rótulos do LHOP estocado no BLH devem ter no mínimo informações ou identificação que permitam a rastreabilidade e facilitem a adequação do uso às necessidades do receptor, tais como: identificação da doadora, conteúdo energético e validade do leite humano. No caso de informatização, o rótulo deverá englobar localizadores que possibilitem identificar as informações necessárias (BRASIL, 2001).

Vale ressaltar a importância de se manter dados do LHO associados às informações contidas no rótulo, ainda que registrados à parte, como: transporte, data da recepção, qualidade físico-química, processamento, identificação do ciclo de pasteurização, controle microbiológico e condições de estocagem, entre outros (BRASIL, 2008) apud (SILVA, 2004).

#### **4.5.3 Verificação de sujidades**

A avaliação da presença de sujidades deve ser realizada por analista capacitado, com o objetivo de determinar prováveis alterações que caracterizam o leite humano ordenhado como impróprio para consumo – leite que contenha corpo estranho no momento da avaliação (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

#### **4.5.4 Verificação da cor**

A cor do leite humano pode variar conforme os seus constituintes e reflete a preponderância de uma determinada fração. O colostro geralmente varia da cor semelhante à água de coco ao amarelo-alaranjado. A coloração do leite de transição muda gradualmente, em aproximadamente duas semanas, para um branco azulado/opaco até se tornar leite maduro (FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

A cor do leite maduro pode ser alterada por diversos fatores, entre eles a dieta materna e o uso de medicações. Alguns corantes utilizados em refrigerantes, sucos e gelatinas têm sido associados a uma coloração rósea ou róseo-alaranjada do leite. Um leite de coloração esverdeada tem sido associado ao uso de grandes quantidades de vegetais pela mãe (coloração dada pela riboflavina), ao consumo de bebidas com corantes verdes e à ingestão de algas marinhas. O leite congelado pode adquirir tonalidade mais amarelada (FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

No início, há predomínio da fração hidrossolúvel, o produto da secreção láctica tende a assumir uma coloração do tipo “água de coco” podendo chegar até a um azul ou verde intenso, de acordo com a presença de componentes hidrossolúveis, resultando diretamente da dieta da nutriz (BRASIL, 2008), na fase intermediária, aumenta a concentração de caseína, e predomínio da fração suspensão, resultando em um produto que tende para o branco-opaco e o estágio final há o aumento dos constituintes lipossolúveis e, a presença de pigmentos que tendem a conferir uma cor

amarelada cada vez mais intensa, as modificações na cor do leite não configuram situações de não conformidade (BRASIL, 2008; FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

As oscilações entre o “vermelho-tijolo” e o marrom-escuro devem ser pesquisadas, pois podem indicar a presença de sangue, o que representa uma não conformidade para a doação, à contaminação com sangue ocorre por descarga papilar (saída de secreção através dos canalículos que extravasam pelo mamilo) sanguinolenta, comum nas duas primeiras semanas de puerpério, por lesão do tipo fissuras do mamilo (FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

#### **4.5.5 Verificação do *off-flavor***

*Off-flavor* é a característica organoléptica não conforme com o aroma original do leite humano ordenhado (BRASIL, 2006). O leite humano é um fluido de reação levemente alcalina e sabor suavemente adocicado nos primeiros 30 dias de lactação, essa decorrência é a relação do cloreto/lactose, esses dois constituintes, além das demais funções biológicas, são os responsáveis pela manutenção da pressão osmótica do LH o lhe conferi um caráter de fluido isotônico.

Com o avançar da lactação, observa-se tendência de elevação no teor de cloretos com proporcional diminuição da lactose, o que permite manter a pressão osmótica estabilizada, essa dinâmica determina o flavor primário, o qual, inicialmente é levemente adocicado, e depois tende para um padrão ligeiramente salgado, a partir do quinto mês de lactação (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

Outro tipo de *flavor*, denominado secundário, pode aparecer no leite humano, decorrente de alterações em sua composição, assim como devido à incorporação de substâncias químicas voláteis (provenientes do meio externo) ou resultantes do crescimento microbiano indesejável, nesses dois

casos, o flavor secundário passa a ser denominado *off-flavor*, e sua presença desqualifica o leite para consumo (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

A determinação do *off-flavor* se configura como importante instrumento na detecção de não conformidades no leite humano ordenhado, sobretudo as que decorrem do crescimento de microrganismos pertencentes à microbiota secundária do leite. A presença desses agentes torna o produto inapropriado para o consumo, principalmente por ocasionar alterações físico-químicas em sua composição (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2008; SILVA, 2004).

#### **4.5.6 Determinação da Acidez ° Dornic**

A técnica utilizada para verificação de acidez no LH é o teste de Dornic, obrigatória no controle de qualidade dos BLH no Brasil, essa análise visa garantir a manutenção das propriedades físico-químicas do LHOC e representa importante elemento para seleção, antes da pasteurização (NOVAK; CORDEIRO, 2007).

Essa técnica tem por objetivo detectar aumentos na concentração de ácido láctico, uma vez que esse ácido é indicativo da fermentação da lactose por bactérias mesófilas. Em condições normais, a acidez Dornic no leite humano varia de 2° a 7° D, e os valores considerados aceitáveis oscilam entre 1,0 e 8,0°D (NOVAK; CORDEIRO, 2007; BRASIL, 2008).

A acidez do LH pode ser classificada como original e desenvolvida, sendo que a acidez original resulta de seus constituintes (micelas de caseína e sais minerais), a acidez desenvolvida é consequente ao crescimento bacteriano, produzindo fermentação e acidificação do leite, podendo levar à redução dos componentes nutricionais e imunológicos e desqualificar sua utilização (NOVAK; CORDEIRO, 2007; BRASIL, 2008).

O LH recém-ordenhado, caso venha a ser titulado imediatamente após a ordenha, apresenta-se praticamente livre de ácido láctico, e sua acidez total pode ser considerada original, com valores oscilando entre 1º e 4º D. À medida que a microbiota encontra condições favoráveis para o crescimento, ocorre à produção de ácido láctico e a consequente elevação da acidez, a acidez maior ou igual a 8º D, desqualificando o produto para o consumo, mesmo apresentando valores inferiores a esse limite, pois a biodisponibilidade do cálcio e a osmolaridade variam de forma inversamente proporcional ao índice de acidez. (ALMEIDA, NOVAK, SANDOVAL, 1998; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

#### **4.5.7 Crematócrito**

Crematócrito é a técnica analítica que permite o cálculo estimado do conteúdo energético do LHO (BRASIL, 2006), sendo que ele reúne em sua composição mais de 250 substâncias diferentes, dispostas de modo hierarquizadas, e compartimentalizado, integrando três subsistemas ou frações: emulsão, suspensão e solução (BRASIL, 2008) apud (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

A análise de crematócrito, segundo a metodologia indicada pela Rede Nacional de Bancos de Leite consiste na centrifugação do LH por 15 min., para a separação do creme, de soro de leite. Contudo, ao sofrer a ação da força centrífuga, a fração emulsão arrasta consigo micelas de caseína, formando um aglomerado denominado creme, ou fração hidrossolúvel, esta proporcionalidade dos constituintes do LH permitem o estabelecimento da relação matemática entre creme, soro, gordura e conteúdo energético (BRASIL, 2008) apud (LUCAS, 1978; LIRA, 2002).

O creme ocupa a parte posterior do capilar e corresponde à fração de coloração mais densa. O soro, de aspecto menos viscoso, fica abaixo do creme. Com auxílio de uma régua milimétrica, que se mede o comprimento da coluna de creme (mm) e da coluna total do produto (coluna de creme +

coluna de soro, expressos em mm) (BRASIL, 2008), o LH com conteúdo energético baixo é rico em substâncias protetoras, sobretudo as que se destacam pela proteção química e biológica exercida no trato digestivo do lactente (BRASIL, 2008) apud (FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

#### **4.5.8 Pasteurização**

Conhecida e praticada no campo da tecnologia de alimentos a pasteurização é um tratamento térmico aplicável ao leite humano, que adotam como referência a inativação térmica do microrganismo mais termoresistente, a pasteurização praticada pelos BLH é eficaz e segura como processo para inativação de agentes patogênicos, a técnica consiste em aquecer o leite humano cru coletado e aprovado pelo controle de qualidade, a uma temperatura de 62,5°C por 30 minutos após o tempo de pré-aquecimento (BRASIL, 2008).

A Resolução RDC n° 12, de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde estabeleceu critérios para controle microbiológico do LH, a pasteurização inadequada traz prejuízos às propriedades benéficas do LHO, e pode também aumentar a suscetibilidade para subseqüentes contaminações (NOVAK et al., 2002; SERAFINI et al., 2003).

#### **4.5.9 A qualidade microbiológica do Leite Humano Ordenhado**

A qualidade microbiológica do LHO distribuído em BLH é um assunto de interesse para a saúde pública, pois as crianças que consumirão este produto têm baixa resistência a infecções neonatais, sendo o desafio dos BLH é o controle bacteriológico do leite doado, sendo que o consumo de LH contaminado pode ser causa de doenças neonatais (SERAFINI et al., 2003).

A abordagem de controlar a qualidade microbiológica na fonte ocorre durante a produção ou a preparação do LHO, de modo que a segurança seja desenvolvida no produto. O método utilizado pelos BLH segue a lógica

preconizada para alimentos, que institui a utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária (BRASIL, 2008).

A detecção de microrganismos coliformes em produtos pasteurizados constitui uma indicação de existência de falhas, em algum ponto no caminho percorrido por LHO, de quebra das boas práticas de procedimento, o que equivale dizer que as informações fornecidas pelo laboratório somente podem ser usadas para apontar as causas da anormalidade, quando se conhece um histórico adequado do produto em questão (NOVAK; ALMEIDA, 2002).

#### **4.6 Microrganismos Indicadores da Qualidade do Leite Humano**

Os microrganismos indicadores são comumente utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à segurança. Neste caso, os microrganismos em questão servem para indicar a presença de patógenos (Jay, 2005). Sendo assim, os indicadores microbiológicos devem apresentar as seguintes características: ser detectável de forma rápida e fácil, ser facilmente distinguível dos demais microrganismos constituintes da flora do alimento, apresentar histórico de associações constantes com o patógeno cuja presença se pretende indicarem, estar sempre presente juntamente com o patógeno de interesse, ser microrganismo cujos números sejam correlacionados às quantidades de patógeno de interesse, ter características e taxas de crescimento equivalentes às de patógeno, apresentar taxa de mortalidade paralela ao do patógeno ou que persista por mais tempo e estar ausente ou em números mínimos nos alimentos que são livres de patógenos (Forsythe, 2002).

Existem outras causas de elevação da quantidade de microrganismos no LHO e estão relacionadas às técnicas inadequadas de coleta, higiene precária da doadora e dos utensílios e manutenção do leite fora da cadeia de frio (NOVAK; CORDEIRO, 2007), dentro deste contexto destaca-se que a presença de microrganismos do grupo coliformes indica a

inobservância dos procedimentos higiênico-sanitários recomendados pela REDEBLH, sendo em um fator de risco para clientela receptora e a desqualificação do LH para o consumo (NOVAK et al., 2001; NOVAK; ALMEIDA, 2002; BRASIL, 2008).

O crescimento de microrganismos em um meio depende de uma série de fatores, entre os quais merecem destaque a presença de barreiras físicas ou químicas, a concentração de nutrientes, a temperatura e a atividade de água (SILVA, 2004). Para crescer, os microrganismos dependem da velocidade das reações enzimáticas que ocorrem em seu citoplasma.

Uma das maneiras de reduzir o crescimento bacteriano é a diminuição da temperatura, pois uma reação enzimática sempre ocorre em uma temperatura ideal (SILVA, 2004). A manipulação do leite ordenhado exige cuidados rigorosos, uma vez que os seus receptores são geralmente recém-nascidos prematuros ou crianças com o sistema imunológico comprometido (BRASIL, 2008) apud (ORTOLANI, 2000).

Os coliformes foram utilizados como indicadores sanitários para detectar contaminação fecal, e assim, medir a presença potencial de patógenos. Os indicadores fecais devem apresentar algumas características adicionais, a saber: a bactéria selecionada demonstrar especificidade, ocorrendo apenas em ambientes intestinais; ocorrer em altas concentrações nas fezes e devem poder ser encontrados em altas diluições; apresentar alta resistência aos ambientes extra entérico, assim como à poluição na qual estão sendo analisados; permitir uma detecção relativamente fácil, rápida e segura, mesmo quando presentes em quantidades muito baixas (Jay, 2005).

O Leite humano Ordenhado Cru (LHOC) só pode ser administrado em situações especiais e desde que seja exclusivamente da mãe para o próprio filho. Nesses casos, deve ter sido coletado em ambiente próprio para este fim, com ordenha conduzida através de supervisão, ele precisa estar devidamente identificado e o consumo deve ocorrer em no máximo 12 horas, com o leite mantido à temperatura não superior a 5°C (BRASIL, 2006).

Em se tratando de UTI neonatal – e considerando que os recém-nascidos internados apresentam risco aumentado de infecção e maior necessidade de imunobiológicos, especialmente os recém-nascidos de extremo baixo peso (< 1000 g) –, quando não houver BLH no serviço de saúde, recomenda-se que o leite cru da própria mãe seja imediatamente resfriado para ser utilizado em no máximo 12 horas (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003).

#### **4.6.1 Coliformes**

Os coliformes são bastonetes não formadores de esporos, aeróbicos e anaeróbicos facultativos, Gram – negativos que fermentam a lactose com formação de gás em 48h a 35°C (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1996), são os indicadores de contaminação mais usados para monitorar a qualidade sanitária, são prejudiciais aos alimentos, e a sua presença determina inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976).

O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, porém, o uso de coliformes fecais mostra-se mais significativo porque esses microrganismos estão restritos ao trato intestinal de animais de sangue quente (DELAZARI, 1998). Altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpezas e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem, além disso, o índice de coliformes fecais, empregado como indicador de contaminação fecal, pode indicar outros patógenos internos (SIQUEIRA, 1995).

#### **4.6.2 Bactérias Heterotróficas**

Outro grupo que vem sendo utilizado como indicador microbiológico é o das bactérias heterotróficas, ou microrganismos mesófilos aeróbicos estritos ou facultativos. Ele é formado por bactérias que são incapazes de

utilizar CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono, mas que precisam desse elemento na forma orgânica, como glicose. Para estas bactérias, que indicam a ocorrência de poluição microbiológica, uma parte do composto orgânico que serve como fonte de energia é utilizada para a síntese de compostos orgânicos necessários ao seu metabolismo. Outras substâncias também podem ser utilizadas como fonte de carbono exclusivas ou parcial, por diferentes espécies bacterianas, entretanto, este grupo não possui ação patogênica. Logo, uma ocorrência excessiva deste grupo indica infecções gerais (KONEMAN et al., 2001).

Essas bactérias também são chamadas de bactérias quimiorganotróficas, porque podem apresentar metabolismo tanto anaeróbio como aeróbio, os nutrientes necessários ao crescimento dessas bactérias estão disponíveis principalmente na decomposição de carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos e álcoois produzindo nitrato e sulfato (JAY, 2005).

De acordo com a temperatura de crescimento, os microrganismos contaminantes do leite podem ser divididos em três grupos principais: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob-refrigeração, os termodúricos que sobrevivem à pasteurização (30 minutos a 63° C ou 15 segundos a 72°C) e os psicrotóxicos, que se multiplicam em temperaturas baixas (7°C ou menos), são comumente empregadas para indicar a qualidade sanitária e estimar a vida útil dos alimentos (VASCONCELOS et al., 2002). Logo, quando presente em grande número, indicam falhas durante a produção (CARDOSO et al., 2000).

O grupo de microrganismos psicrófilos inclui bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, se desenvolvem em temperaturas abaixo de 07°C, causadores de deterioração do leite devido à produção de protease, lipase e fosfolipase hidrolisando a proteína e a gordura do leite alterando o seu sabor e odor. (ARCURI et al., 2008 apud FRANK et al., 1992).

As bactérias psicrotóxicas no leite humano causam degradação das proteínas e gordura do leite, essa ação deletéria resulta de proteases e lipases termoestáveis, ataque proteolítico à caseína e aumento dos

compostos nitrogenados de baixo peso molecular, que atuam como nutrientes para os contaminantes pós-pasteurização (BRITO; DIAS, 1998).

Geralmente as bactérias psicrófilas, são mesófilas, isto é, a temperatura ótima de multiplicação é entre 25 a 35°C. Entretanto, possuem a capacidade de se multiplicar a baixas temperaturas, embora de forma mais lenta. A contaminação do leite com essas bactérias se dá, geralmente, devido a falhas nos processos de higienização da ordenha e falhas na limpeza, refrigeração e/ou utensílios que entram em contato com o leite, sendo os principais gêneros: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* e *Flavobacterium* (BRITO; DIAS, 1998).

O grupo de microrganismos termófilos são aquelas a qual a temperatura de crescimento de crescimento mínimo é em torno de 35°C e a temperatura ótima para o crescimento situa-se entre 55 e 65°C, podendo atingir 75 e 90°C para espécie. No leite cru contém a poucas bactérias termófilas, entretanto pode reproduzir e atingir elevado número em temperaturas altas, essas bactérias causam problemas na pasteurização quando mantidas em tempo inferior a 30 minutos e na variação 50 a 70°C (PINHEIRO, 2005 apud SILVEIRA, 1998).

As bactérias termodúricas resistem à pasteurização por suportam temperaturas menor que 100°C e por produzem esporos que são formas de resistência contra condições adversas. Exemplos de gêneros com espécies esporuladas são *Clostridium* e *Bacillus*. Os esporos são inertes, não apresentam atividade metabólica e não se multiplicam, sendo extremamente resistentes ao calor necessitando-se, em geral, de 20 minutos a 120°C para serem inativados (BRITO; DIAS, 1998).

#### **4.6.3 *Staphylococcus* spp.**

Os *Staphylococcus* spp. são bactérias do tipo cocos da família Micrococcaceae, imóveis, agrupados em massas irregulares, são aeróbios

ou anaeróbios facultativos e fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose, como anaerobiose. Segundo Pelczar et al. (1981), os são habitantes naturais do organismo animal, o qual serve de fonte para esse microbiota encontrado em toda parte. Como agente patogênico causa processo supurativo, variando desde espinhas, furúnculos e abscessos até septicemias fatais; são, ainda, invasores secundários de peritonites, cistites e meningites.

*Staphylococcus* são saprófito e é encontrado na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40% e na boca e saliva de 10 a 35% (SERAFINI, 2003) apud (HERCEG, et al., 1990). Sua presença, porém, no leite humano pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele, da pele de mamilo, cavidade oral e nasal, e/ou por condições higiênicas sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados. A maior preocupação quanto à sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização (ALMEIDA, et al 1998).

Como bactérias mesófilas os *Staphylococcus* tem crescimento na faixa 7°C a 47,8°C, e em relação ao pH o crescimento é na faixa de 4 a 9,8 e ótimo entre 6 e 7 pH, e seu habitat e a cavidade nasal, pele e a pele do mamilo (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A presença indicativa desse contaminante é externa sendo proveniente de manipuladores, utensílios e equipamentos segundo (PONTES; IVASAKI; OLIVEIRA, 2003).

#### **4.6.4 Fungos filamentosos e leveduriformes**

Segundo Norvak (2002), os fungos apresentam aproximadamente 70.000 espécies que já foram catalogadas, entretanto, estima-se que o número seja de aproximadamente 1,5 milhão, são organismos de grande importância, pois constituem associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), oferecem sistemas genéticos para os biólogos moleculares, e são cruciais para a biotecnologia industrial. São decompositores primários nos ecossistemas terrestres, todavia, são

indesejáveis em alimentos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os mesmos, provocam sua deterioração. Além disso, ao se multiplicam, liberam metabólitos com a denominação genérica de “micotoxinas” e, que ao serem ingeridos em alimentos, produzem alterações biológicas prejudiciais.

Como os fungos ocorrem em grande escala na natureza, a presença de bolores e leveduras em alimentos indicar contaminação advinda do meio ambiente ou resultando de manipulação em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (SERAFINI, 2003). Norvak, (2002) relata que o LHO, obtido de mulheres sadias, em medidas assepsia, pode apresentar contaminantes considerados normais, quando a presença de fungos e bolores de diferentes espécies, este sugere que as condições higiênico-sanitárias no momento da obtenção do leite, entre as espécies de fungos miceliais mais representativa no leite humano temos os seguintes microorganismos: *Aspergillus* Grupo Niger; *Aspergillus* spp.; *Paecilomyces* spp.; *Penicillium* spp.; *Rhizopus* spp.; *Syncephalastrum* spp..

#### **4.6.5 Tipo de Pesquisa**

A pesquisa é uma atividade dentro das ciências que possibilita a aproximação de entendimento de um fenômeno a ser investigado, o qual é um processo sucessivo de aproximação permanente da realidade. Segundo Gerhardt; Silveira, (2009) a pesquisa científica é o resultado de um inquérito ou minucioso, realizado com o objetivo de resolver um problema, recorrendo a procedimentos científicos. Gerhardt; Silveira, (2009) apud Lehfeld (1991) refere-se à pesquisa como sendo a inquisição, o procedimento sistemático e intensivo, que tem por objetivo descobrir e interpretar os fatos que estão inseridos em uma determinada realidade.

A pesquisa qualitativa tende a salientar os aspectos dinâmicos, holísticos e individuais da experiência humana, para aprender a totalidade no contexto daqueles que estão vivenciando o fenômeno (POLIT, BECKER

E HUNGLER, 2004, p. 201). A pesquisa quantitativa, que tem suas raízes no pensamento positivista lógico, tende a enfatizar o raciocínio dedutivo, as regras da lógica e os atributos mensuráveis da experiência humana Gerhardt; Silveira, (2009). Fonseca, (2002) descreve que a pesquisa quantitativa recorre à linguagem matemática para descrever as causas de um fenômeno, as relações entre variáveis.

Para Gil (2007), a pesquisa experimental consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto. Sendo assim, a elaboração de instrumentos para a coleta de dados deve ser submetida a testes para assegurar sua eficácia em medir aquilo que a pesquisa se propõe a medir, podendo ser desenvolvida em laboratório (onde o meio ambiente criado é artificial). Já Fonseca (2002, p. 38) descreve que a pesquisa experimental os efeitos observados são relacionados com as variações nos estímulos, pois o propósito da pesquisa experimental é aprender as relações de causa e efeito ao eliminar explicações conflitantes das descobertas realizadas.

Para Guedes et al., (2005) a interpretação de análise de dados através estatística descritiva, cujo objetivo básico é o de sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo dessa forma que se tenha uma visão global da variação desses valores, organizado e descreve os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e de medidas descritivas.

Trata-se de um estudo quantitativo e experimental, segundo Diehl (2004) a pesquisa quantitativa pelo uso da quantificação, tanto na coleta quanto no tratamento das informações, utilizando - se técnicas estatísticas, objetivando resultados que evitem possíveis distorções de análise e interpretação, possibilitando uma maior margem de segurança. O estudo experimental segue um planejamento rigoroso, para Gil (2007), a pesquisa experimental consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influencia-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto.

## **5. MATERIAIS E METODOS**

### **5.1 Aspecto Ético**

Trata-se de um estudo quantitativo e experimental, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, CAAE: 44069315.000005540 Parecer: 1.8088.916 de 12/05/2015, que seguiram a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, sendo também avaliado e aprovado pela Comissão Interna de Ética na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos. A coleta de amostras do LH ocorreu no período de julho de 2015 a março de 2016. Foram coletados 30 frascos, contendo 250 mL em cada, e a inclusão amostral foi representada por Leite Humano Ordenado (LHO), qualificado como impróprio para o consumo, conforme estabelecido pela RDC nº 171.

### **5.2 Ambiente experimental**

Trata-se de um estudo quantitativo e experimental e a coleta do material de pesquisa foi captada no Banco de Leite Humano José Eduardo Ungari o qual este inserido na Maternidade Marina Cintra sendo esta parte da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos situado na Rua Paulino de Abreu Sampaio, 573, Vila Pureza na cidade de São Carlos, após a realização da coleta do material de pesquisa este foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) no Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) localizada na Rodovia Washington Luís KM 235 - SP 310 - Jardim Guanabara, São Carlos - SP, onde os procedimentos de análise foram realizados.

As amostras do leite humano utilizada na presente pesquisa foram consideradas inviabilizadas pelo banco de leite, pois durante o degelo para o processo de pasteurização no Banco de Leite, foi retirada uma alíquota de

cada frasco do leite humano para análise microbiológica e da acidez Dornic. Após o resultado desta alíquota foi-se consideradas dentro da conformidade e/ou o impróprio para consumo do recém-nascido. Das 30 amostras de LH 01 foi de LHO Cru e 29 de LHO Pasteurizado, a informação dos parâmetros físico-químicas do teor energético (K) e da Acidez ( $^{\circ}$  D) do foi realizado no BLH e a informação compartilhada. As amostras foram transportadas a cadeia de frio do local de coleta no BLH até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) no Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em recipientes isotérmicos, respeitando as normas conforme estabelecido pela RDC nº 171 apresentado na Figura 3, acondicionadas no freezer sob a temperatura de  $-3^{\circ}$  C para posterior análise microbiológica em 24 horas. Para análise microbiológica procedeu-se de acordo com o método descrito Compendium of methods for the microbiological examination of foods American Public Health Association (APHA), 1996. Os resultados obtidos foram inseridos no programa Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS) da IBM, versão 19.0, para posteriores análises das variáveis através da estatística descritiva e correlação o Linear de Pearson.

#### Equipamento para manutenção da cadeia a frio no transporte da amostra



Figura 3 - Recipiente isotérmico e termômetro  
Arquivo do autor

### 5.3 Aferição do parâmetro físico-químico (pH) do Leite Humano

Análise de parâmetro físico-química do potencial hidrogeniônico (pH) do Leite Humano (LH) ocorreu logo após o degelo em banho Maria regulada em 40°C e controlada para que fique em 5°C máximo a temperatura da água, o frasco foi imerso, ficando acima da altura do nível do leite e realizando leves agitações, após 5 minutos, o LH foi acondicionado em um Becker (50 mL), procedendo a apreciação do pH com a imersão do eletrodo no LH por 1 minuto e efetuado a leitura, este procedimento foi repetido três vezes para cada amostra e retirando-se a média aritmética para o valor de pH e registrado para posterior análise estatística.

#### Aferição do potencial hidrogeniônico (pH) do leite humano



Figura 4 – Imagem do pHmetro  
Arquivo do autor

### 5.4 Preparo do meio para cultura de microrganismos e diluição seriada das amostras para microrganismos heterotróficos

A detecção de microrganismos heterotróficos iniciou-se com a realização da diluição seriada da amostra de LH em solução salina peptonada. Cada amostra foi pipetada em campo de chama e a diluição

inicial  $10^0$  foi constituída de 10 ml de LH, a diluição  $10^{-1}$  foi constituída pela retirando 01 mL da diluição  $10^0$  e transferido para outro tubo de ensaio com 09 mL de solução salina peptonada, a diluição  $10^{-2}$ , foi preparada retirando 01 mL da diluição  $10^{-1}$  e transferindo para tubo com 09 mL de solução salina peptonada, assim formou se as diluições  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ . A identificação de microrganismos heterotróficos procedeu-se de acordo com o método descrito American Public Health Association (APHA, 1996). Alíquotas de 01 mL da amostra de LH e de suas diluições decimais seriadas foram semeadas em duplicata, pela técnica de inoculação em placas de petri (90 x 15 mm) estéreis contendo de 10 a 15 mL utilizando o meio de Cultura Plate Count (PCA – Himedia®) solidificado e a inoculação em superfície foi o com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas invertidas a  $37^\circ$  C por 24 horas para o grupo de Mesófilos, a  $42,5^\circ$  C por 24 horas para o grupo de Termófilos e de  $07^\circ$  C por 07 dias para o grupo de Psicrófilos os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de LH.

A pesquisa de *Staphylococcus* spp. procedeu-se de acordo com o método descrito APHA conforme descrito anteriormente, e utilizando o meio de cultura Agar Sal Manitol (Kasvi ®), solidificado e a inoculação em superfície foi o com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas e invertidas a  $37^\circ$  C por 24 horas, havendo a presença de colônias *Staphylococcus* spp., será feito a coagulase e catalase e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de LH. Para a quantificação de fungos filamentosos e leveduriformes, procedeu-se de acordo com o método descrito APHA conforme descrito anteriormente, e utilizando o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (Kasvi ®), solidificado e a inoculação em superfície foi o com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas e invertidas a  $37^\circ$  C por 24 horas, os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de LH. Foi considerada a contagem padrão em placas, multiplicada a sua média aritmética pelo respectivo fator de diluição e o resultado foi expresso

em Unidades Formadoras de Colônias/mL de amostra (UFC/mL) e registrado para posterior análise estatística.

### Esquemática da diluição em placa de petri com meio sólido com o Leite Humano

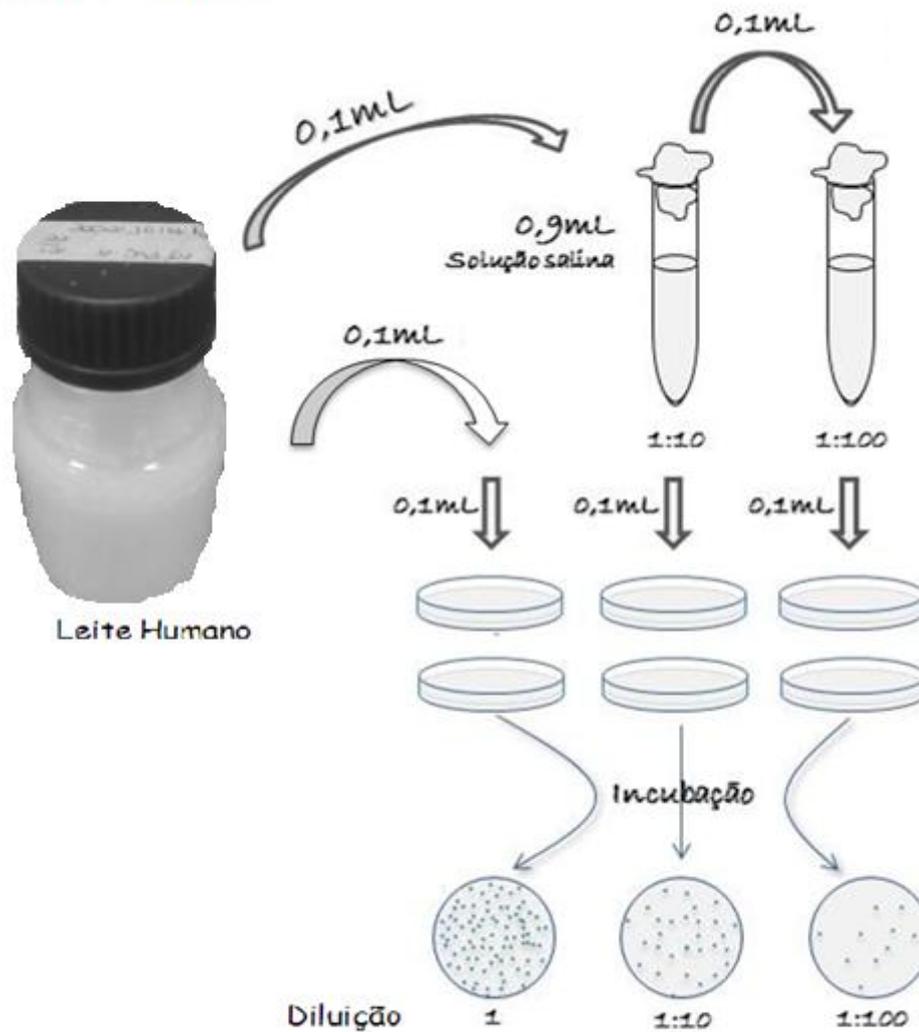


Figura 5 – Esquemática da diluição do Leite Humano  
Fonte: Do autor

### 5.5 Número mais Provável (NMP) de Coliformes totais/termotolerantes

Para Contagem de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes, foi realizada a prova presuntiva, mediante inoculação de 1 mL de Leite

humano em um tubo contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (CLSS) (Kasvi®) em triplicata, a qual continha em seu interior tubos de Durham invertidos, a seguir foi realizado a diluições seriadas de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , ou seja, foi retirada 1 mL do tubo de ensaio contendo a amostra e foi transferido para outro tubo de ensaio com 9 mL de CLSS que corresponde a diluição  $10^{-1}$ , a diluição  $10^{-2}$ , foi preparada retirando 1 ml da diluição  $10^{-1}$  e transferindo para tubo com 9 mL de CLSS, os tubos de diluições seriados também foram em triplicata contendo em seu interior tubos de Durham invertidos. Esses tubos contendo (Amostra,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) foram incubados a 37°C por 24h, sendo que foi utilizada a contagem no Método do Número Mais Provável através Bacteriological Analytical Manual 2010.

O indício da presença de bactérias do grupo coliforme foi verificado pela formação de gases e/ou turvação do meio dentro dos tubos de Durham. Nos tubos onde foi verificado crescimento bacteriano com a produção de gases/ou turvação do meio realizou-se o Teste Confirmatório, que consistiu na transferência de 1 mL da diluição e a sua respectiva amostra em triplicata e seriado que apresentou cultura com o teste positivo para tubos contendo 9 mL de Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2% (BGBL – (Kasvi®) e também para tubos contendo 9 mL de Caldo EC (Kasvi®) ambos contendo em seu interior tubos de Durham invertidos.

Para a contagem de Coliformes Totais, os tubos de Caldo Verde Brilhante Bile (VB) foram incubados a 37°C por 24h. O número de tubos com gases/ou turvação, confirmativo de presença de Coliformes Totais foi registrado a fim de se determinar o Número Mais Provável (NMP) / mL e posterior análise estatística. Já para a contagem de Coliformes Termotolerantes, os tubos de Caldo EC foram incubados a 42,5°C por 24h. O número de tubos com gases/ou turvação, confirmativo de presença de Coliformes Termotolerantes foi registrado a fim de se determinar o Número Mais Provável (NMP) / mL e posterior análise estatística.

### Esquemática NMP de coliformes série de 3 tubos no leite humano

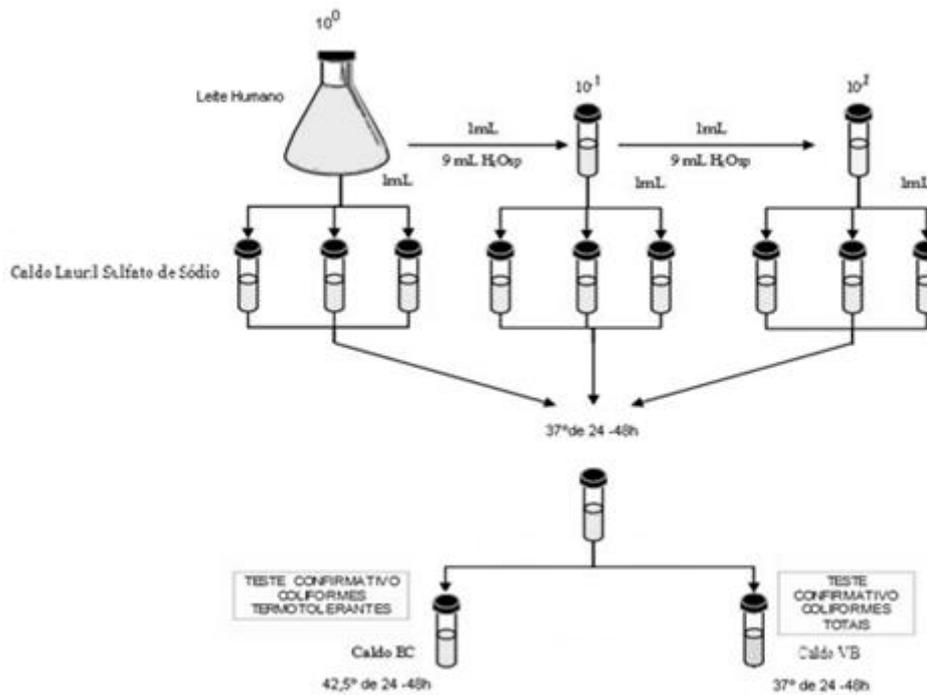


Figura 6 – Esquemática NMP de coliformes para série de 3 tubos  
Fonte: Do autor

### 5.6 Análise de Dados

Para análise dos resultados foi utilizado à estatística descritiva e exploratória a qual proporciona uma visão do comportamento geral do conjunto de dados em relação ao objetivo do estudo, foi utilizada para as análises das medidas como: mínimo, mediana, média, máximo, desvio padrão, coeficiente de variação, gráficos de setores, gráfico de barras, e o coeficiente de correlação de Pearson através do programa Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS) da IBM, versão 19.0.

## 6. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises em todas as amostras deste estudo, porém, das 30 amostras doadas 01 foi de Leite Humano Ordenhado Cru (LHOC) e 29 amostras são de Leite Humano Ordenhado Pasteurizado (LHOP) a amostra de LHOC por apresentar uma única amostra foi descartada, devido à falta de outros similares a esta para comparações.

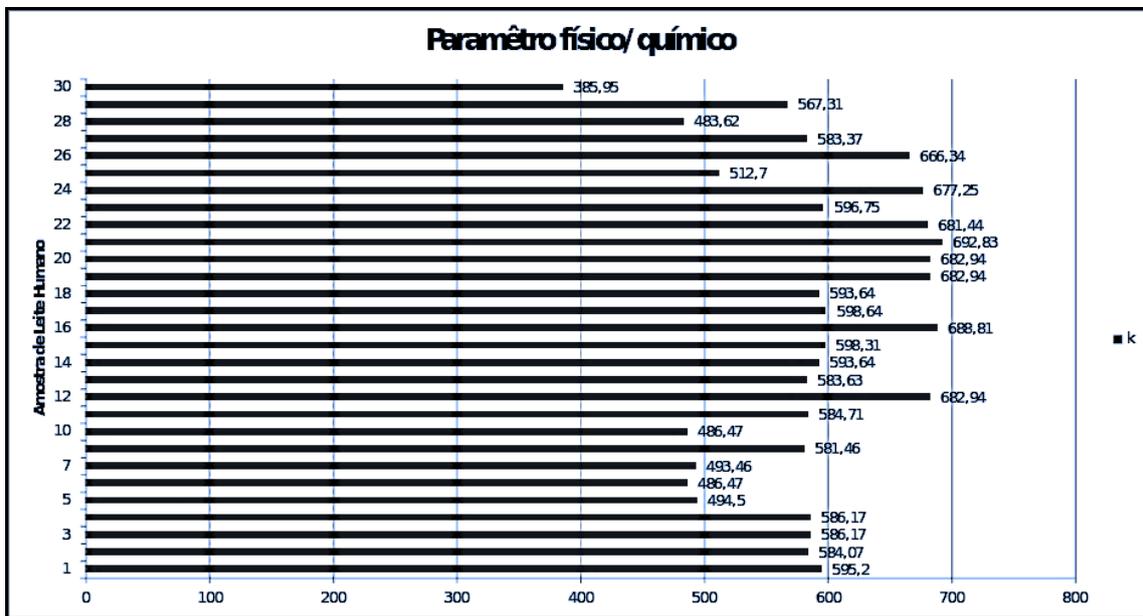
Os resultados das análises foram divididos didaticamente em partes distintas, e as informações apresentadas em gráficos e tabelas, que correlacionam entre si. Na tabela 1 do (Apêndice 01) apresenta-se a tabulação do Número Mais Provável (NMP), utilizada para a quantificação de coliformes através do NMP/mL para série de 03 tubos. Na tabela 02 do (Apêndice 02) apresenta-se de forma geral o resultado físico-químico da acidez Dornic, pH, K e o grupo microbiano com a sua respectiva quantificação da Unidade Formadora de Colônia (UFC) mL e a quantificação dos Coliformes nas fases Presuntiva e Confirmativa Verde Brilhante (VB) e *Escherichia Coli* (EC) através do NMP/mL nas amostras analisadas.

### 6.1 Parâmetros físico/químicos do leite humano ordenhado pasteurizado

#### 6.1.1 Teor Energético (K)

A Figura 04 apresenta o teor Energético (K) com valores das 29 amostras estudadas, e dados estatísticos respectivos. Observa-se o valor mínimo de 385,95 e valor máximo de 692,83 e a média de 5,87 com um desvio padrão de 77,38 e a variância 5987,66.

**Figura 7 - Parâmetro físico/químico do Valor Energético (K) do Leite Humano Ordenhado**



Fonte: Dados do autor

O teor de gordura do leite humano foi determinado através da técnica do crematócrito (RONA, et al., 2008 apud LUCAS et al., 1978). Segundo Cavalcanti et al., (2005), o leite humano contém 40 gramas de gordura/litro e 700 kcal/litro. Metade do valor energético do leite humano é oriundo dos lipídios sendo coerente afirmar que, quanto maior a concentração de gordura total, grande é a possibilidade de o leite humano apresentar elevação da acidez. A gordura contribui com aproximadamente 55% do conteúdo energético não proteico e contém ácidos graxos  $\omega$ -3 de cadeia muito longa, ou seja, (20:5  $\omega$ -3 e 22:6  $\omega$ -3), essencial para o desenvolvimento do recém-nascido (RONA et al., 2008 et al apud KOLETZKO e RODRIGUEZ-PALMEO 1999). Na tabela 03 apresentam-se os valores das amostras, da Acidez  $^{\circ}$  Dornic, de K, a distribuição da frequência e o seu percentual.

Tabela 3 – Distribuição do Teor Energético (K)

<b>Amostra</b>	<b>Acidez ° Dornic</b>	<b>Valores K</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
30	5	385,95	01	3,4%
28	3	483,62	01	3,4%
06 e 10	10 e 8	486,47	02	6,9%
07	5	493,46	01	3,4%
05	8	494,50	01	3,4%
25	8	512,70	01	3,4%
29	5	567,31	01	3,4%
08	8	581,46	01	3,4%
27	9	583,37	01	3,4%
13	8	583,63	01	3,4%
02	8	584,07	01	3,4%
11	3	584,71	01	3,4%
03 e 04	8 e 8	586,17	02	6,9%
14 e 18	9 e 8	593,64	02	6,9%
01	8	595,20	01	3,4%
23	8	596,75	01	3,4%
15	15	598,31	01	3,4%
17	9	598,64	01	3,4%
26	10	666,34	01	3,4%
24	8	677,25	01	3,4%
22	9	681,44	01	6,9%
12, 19 e 20	5, 8 e 8	682,94	03	10,3%
16	8	688,81	01	6,9%
21	8	692,83	01	3,4%
<b>Total 29</b>				

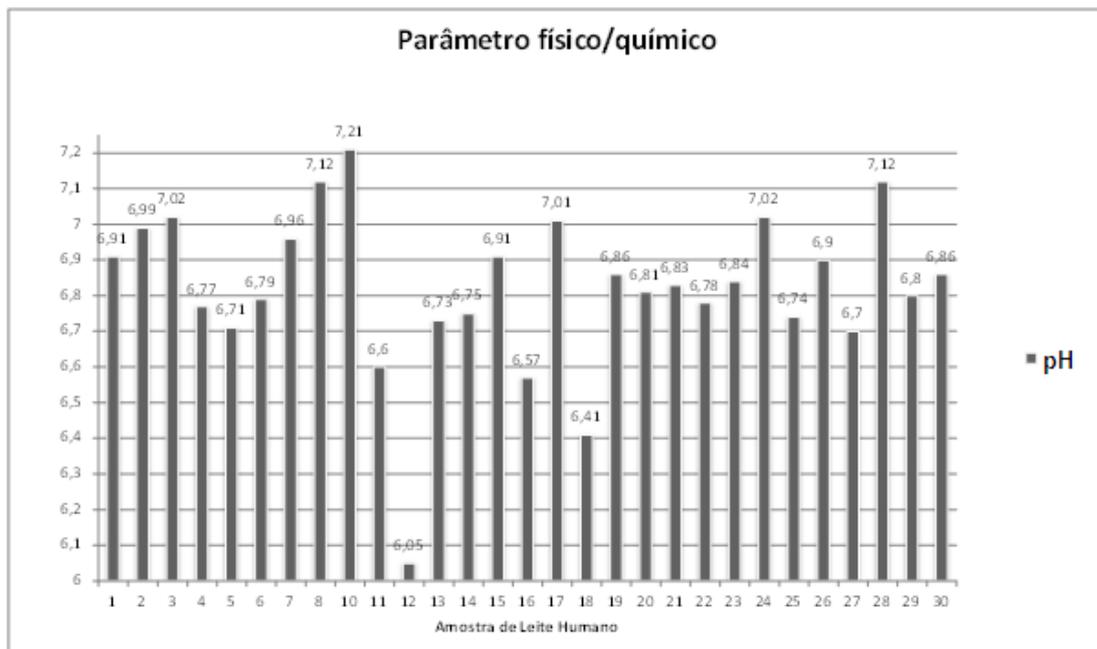
Fonte do autor.

Estudo apresentado por Rona et al., (2008), denota que a variabilidade do valor energético é um conjunto de resultados das características individuais das doadoras, do período da lactação, de perdas durante o processo de estocagem e a própria amostra de leite (leite de início e/ou final da mamada). Segundo as recomendações do Regulamento Técnico para o funcionamento de Banco de Leite Humano, que classifica em agrupamentos de classes o teor calórico como sendo: < 500 Kcal/L; 500 e 600 Kcal/L; 600 e 700 Kcal/L; 700 e 800 Kcal/L; ≥ 800 Kcal/L. Nesse estudo as 29 amostras o valor de K apresentam valor mínimo de 385,95 e valor máximo de 692,83.

### 6.1.2 pH

O valor do pH do LHO evidencia a variação entre 5,47 à 7,84, sendo levemente alcalino, e essa oscilação consiste do período da lactação (CAVALCANTE et al., 2005). A Figura 05 apresenta os resultados expressos do valor de pH nas 29 amostras, para este estudo os valores de pH estão coerentes com a variação apresentada na literatura. Para os dados estatísticos do pH apresentou valor mínimo de 6,5 e o máximo de 7,21 com a média de 6,8. O valor da variância é de 0,52 e o desvio padrão é de 0,227.

**Figura 8 - Parâmetro físico/químico do pH do Leite Humano**



Fonte: Dados do autor

Estudo realizado por Rona et al., (2008), evidenciou que o pH do leite humano possui propriedades importantes e entre elas a estabilidade da caseína. A conservação inadequada do leite humano após a coleta ocasiona progressiva acidez, que desestabiliza as micelas de caseínas e o cálcio torna-se menos disponível. Covas et al., (2000) também em seus estudos relataram que o leite humano em refrigeração de 4°C é submetido à reações lipolítica e proteolítica liberando ácidos graxos e aminoácidos livres,

resultando na diminuição de pH. No presente trabalho não transcorreu a diminuição do pH. Na Tabela 04 pode-se observar os valores de pH em relação a distribuição da frequência e o seu percentual.

Tabela 4 – Distribuição da amostra com o valor de pH, a frequência e percentual

<b>Amostras nº</b>	<b>Valores pH</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
12	6,05	01	3,4%
18	6,41	01	3,4%
16	6,57	01	3,4%
11	6,60	01	3,4%
27	6,70	01	3,4%
05	6,71	01	3,4%
13	6,73	01	3,4%
25	6,74	01	3,4%
14	6,75	01	3,4%
04	6,77	01	3,4%
22	6,78	01	3,4%
06	6,79	01	3,4%
29	6,80	01	3,4%
20	6,81	01	3,4%
21	6,83	01	3,4%
23	6,84	01	3,4%
19 e 30	6,86	02	6,9%
26	6,90	01	3,4%
01 e 15	6,91	02	6,9%
07	6,96	01	3,4%
02	6,99	01	3,4%
17	7,01	01	3,4%
03 e 24	7,02	02	6,9%
08 e 28	7,12	02	6,9%
10	7,21	01	3,4%
Total 29			

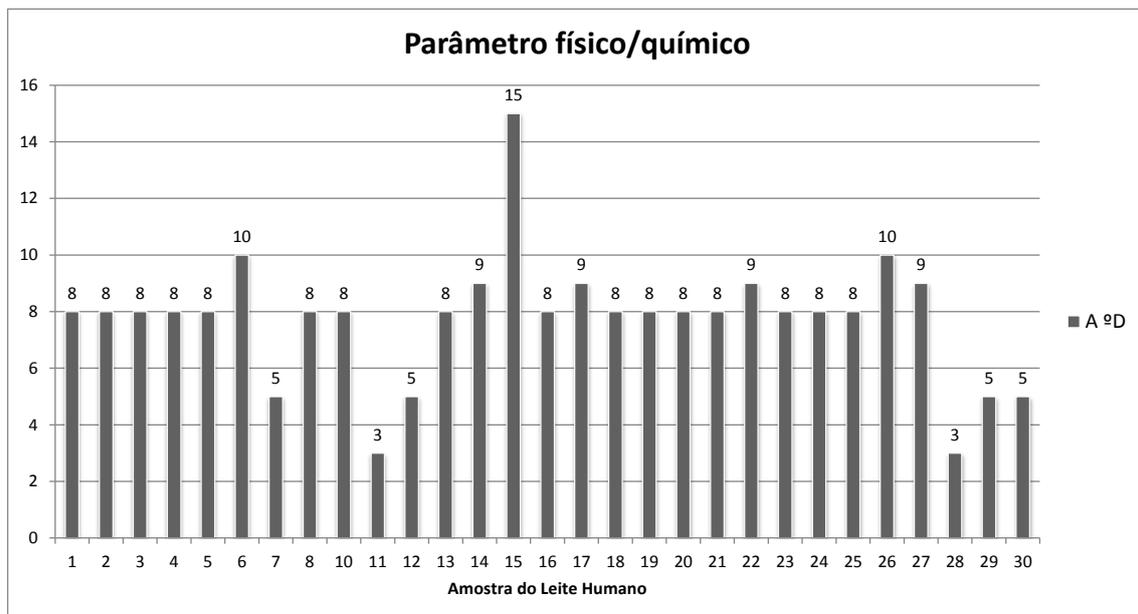
Fonte: Dados do autor.

O LHO não dispõe de uma constante para um sistema tamponante, uma vez que, possui baixa concentração ao potencial hidrogeniônico de íons livres, a quantidade de ácidos pré-formados não é obtida por esse parâmetro para a mensuração da acidez titulável do leite humano (CAVALCANTE et al., 2005). Esta mensuração ocorre através da avaliação em Graus Dornic, técnica obrigatória no BLH sendo um parâmetro que visa garantir a manutenção das propriedades físico-químicas do leite humano para a seleção do produto antes de disponibiliza-lo ao recém-nascido.

### 6.1.3 Acidez Dornic

Na Figura 06 são apresentados os valores da acidez ° D para as 29 amostras, estudadas. São descritos os dados estatísticos com valor mínimo de 03 e máximo de 15 (média de 7,79). O valor da variância foi de 5,2 e o desvio padrão de 2,29.

**Figura 9 - Parâmetro físico/químico da acidez Dornic do Leite Humano**



Fonte: Dados do autor

Em condições normais a acidez Dornic no leite humano tem uma variação de 2º a 7º Dornic. Conforme BRASIL (2001) o leite humano não deve apresentar acidez superior 8º D, a FIOCRUZ, (2006) preconiza no BLH que amostras de leite humano que apresentam a titulação da acidez inferior a  $\leq 8^\circ$  D, serão envazadas para posteriormente serem pasteurizadas e as que apresentam a acidez  $\geq 8^\circ$  D são consideradas impróprias ao consumo.

Rona et al., (2008) relatam que acidez no leite humano é resultado do ácido láctico e outros ácidos que foram degradados da lactose através da ação microbiana. Galhardo et al., (2002) apresentou em seus estudos que acidez titulável possui outra fonte relacionada, não apenas com a qualidade higiênico-sanitário, mas durante o armazenamento ocorre oxidação lipídica, elevando a acidez, neste estudo não houve o armazenamento do leite humano, as amostras foram transportados em rede frio conservado a mesma temperatura e analisadas a seguir.

Segundo a FIOCRUZ, (2006) no leite humano a acidez é mencionada de acordo com a classificação original ou desenvolvida. A original é resultante de seus constituintes no leite e a desenvolvida é decorrente da degradação do ácido láctico através da ação microbiana. A microbiota primária e secundária do leite humano possui habilidade para fermentação da lactose. O aumento da acidez é decorrente da metabolização da lactose, assim sendo, para cada molécula de lactose resulta em 4 moléculas de ácido láctico, elevando a acidez, ocorre a osmolaridade e a redução da biodisponibilidade de cálcio e fósforo, resultante da desestabilização de micelas de caseína, formando a precipitação decorrente da ação do ácido láctico no leite humano.

Ao cruzar os dados com a acidez elevada com o pH e o K, encontrou-se um valor correspondente de 29,68% (n=6) nas amostras que apresentaram crescimento microbiano entre 20 a 130 UFC/ml. Ao pormenorizar os dados, observou-se que para as amostras de nº (06) e (26) a acidez foi de 10º Dornic, o valor de K= (486,47) e (666,34); (00) e (130)UFC/ml; para o pH (6,79) e (6,90). Para as amostras de nº (14), (17) e

(22) o valor de K= (593,64), (598,64) e (681,44); (20), (45) e (00) UFC/ml; pH (6,75), (7,01) e (6,78);, porém para a amostra de nº (15) com a acidez 15º Dornic o valor de K= (598,31) e (30) UFC/ml e pH (6,91). Para os dados encontrados nessa pesquisa em relação a (K) há consonância com a literatura. Segundo Cavalcante et al., (2005), quanto maior o valor energético menor o pH e maior a acidez, exemplo da amostra (26). Neste estudo, porém, o valor de K é inferior ao de pH nas amostras (06), (14), (17), (22) e (15), sendo que nas amostras (6) e (22) não houve crescimento bacteriano. A Tabela 5 apresenta a distribuição da acidez ° Dornic, com os seus respectivos valores, frequência e a percentual. Observou-se que houve uma variação dos valores da acidez de 3º a 15º D das amostras analisadas.

Tabela 5 – Distribuição da Acidez Dornic

<b>Valores Acidez ° D</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
03	02	6,9%
05	04	13,8%
08	16	55,2%
09	04	13,8%
10	02	6,9%
15	01	3,4%
Total 29		

Fonte: Dados do autor

O valor da acidez Dornic demonstrado na Tabela 5 evidenciou índice da acidez de 3º e 5º D com um percentual de 6,9% e 13% sendo considerado adequado para consumo. Em relação ao limite estabelecido de  $\leq 8^\circ$  D foram encontradas 55,2% das amostras e com acidez acima de 8º D foi evidenciado 9º, 10º, 15º D com percentual de 13,8%, 6,9% 3,5%, respectivamente. Estes valores foram considerados inapropriados ao consumo devido à elevação da acidez. Para maior entendimento desse contexto a distribuição da acidez Dornic foi separada em dois grupos de contingência, amostras com acidez  $\leq 8^\circ$  D (Tabela 6) e amostras com acidez  $\geq 8^\circ$  D na (Tabela 7).

Tabela 6 – Contingência amostral relacionada à presença/ausência de microrganismos em relação à acidez  $\leq 8^\circ$  Dornic.

Amostra	Acidez $^\circ$ D	Microrganismo	
		Presença	Ausência
1	8	-	+
2	8	-	+
3	8	-	+
4	8	+	-
5	8	+	-
6	10	+	-
7	5	+	-
8	8	+	-
10	8	+	-
11	3	+	-
12	5	+	-
13	8	+	-
16	8	+	-
18	8	-	+
19	8	+	-
20	8	+	-
21	8	+	-
23	8	+	-
24	8	+	-
25	8	+	-
28	3	+	-
29	5	+	-
30	5	+	-

Fonte: Dados do autor

Observa-se que ao compararem-se os dados das na Tabela 5 e 6 em relação ao limite estabelecido de  $\leq 8^\circ$  D, 18 amostras apresentam percentual de 55,2% do total de amostras. Nestas 4 amostras (13,79%) há ausência de microrganismo 1, 2, 3 e 18. As amostras 4, 5 e 23, apresentam

coliformes e a amostra 08, há a presença de microrganismos psicrófilos e mesófilos. A amostra 10 apresenta termófilos, fungos filamentosos e leveduriforme e presença de coliformes. As amostras 13, 16, 19 e 24, há presença de mesófilos e coliformes. Na amostra 20 detectaram-se mesófilos, termófilos, fungos filamentosos e leveduriformes e coliformes e amostras 21 e 25, observou-se psicrófilos, mesófilos, termófilos, fungos filamentosos e leveduriforme e coliformes. Neste estudo evidenciou-se uma visão geral da carga microbiana ao limite estabelecido de  $\leq 8^\circ$ , e a sua estreita correlação com os valores de acidez Dornic, vindo de encontro com a literatura que é um método eficaz para avaliação do crescimento microbiano no leite humano.

Tabela 7 – Contingência amostral relacionada à presença/ausência de microrganismos em relação à aprovação da acidez  $\geq 8^\circ$  Dornic.

Amostra	Acidez ° D	Microrganismo	
		Presença	Ausência
06	10	+	-
14	09	+	-
15	15	+	-
17	09	+	-
22	09	+	-
26	10	+	-
27	09	+	-

Fonte: Dados do autor

Com a apresentação da Tabela 7 pode-se evidenciar que acidez e a contagem de valores entre  $3^\circ$  e  $5^\circ$  Dornic há a presença de microrganismos (amostras 7, 11, 12, 28, 29 e 30). Porém há elevada presença microbiana, ao compararmos a Tabela 6 e a 02. Observou-se na amostra 07 a presença de  $240 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes, sendo  $21 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes

totais. A amostra 11 apresentou  $21 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes, sendo  $21 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes totais. A amostra 12 apresentou  $3,6 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes, sendo  $3,6 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes totais. A amostra 28 apresentou  $14 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes e  $3,6 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes fecais. A amostra 29 apresentou  $20 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes, com  $9,2 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes totais. A amostra 30 apresentou  $15 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes, e  $3,6 \times 10^0$  NMP/ml de coliformes fecais, com estes dados expõe-se a importância do controle microbiológico do Banco de Leite através do grupo coliforme.

Foi evidenciado também que as amostras 1, 2, 3 e 18 (13,79%) não apresentaram presença de microrganismos, porém as mesmas foram desprezadas. Deduz-se que o banco de leite trabalhou com uma margem de segurança levando em consideração à clientela receptora, a sensibilidade do recém-nascido, a excepcionalidade dos prematuros, a susceptibilidade a infecções, o desfavorecimento imunológico, além do retardo na maturação do sistema imune e do aparelho intestinal. Estudo realizado por Cavalcante et al., (2005) evidenciou que o leite humano tem sobrecargas ácidas e básicas que resultaria em acidose ou alcalose e a sua utilização pode vir a causar enterocolite necrosante no neonato prematuro. A Tabela 07 apresenta Contingência amostral relacionada à presença/ausência de microrganismos em relação à acidez  $\geq 8^\circ$  Dornic.

Na Tabela 07, ao comparar as informações com os dados da Tabela 03 observa-se que a amostra 06 há a presença de coliformes e na mostra 14 há a presença de microrganismo psicrófilos e mesófilo, fungos filamentosos e leveduriforme juntamente com há a presença de coliformes, as amostra 15 e 17 contém a presença de mesofilo, fungos filamentosos e leveduriforme e de coliformes, na amostra 22 há a presença de coliformes totais e fecais, as amostras 26 e 27 há a presença do microrganismo mesófilo, termófilo, fungos filamentosos e leveduriforme e coliformes totais, sendo a amostra 26 também a presença do grupo de coliformes fecal.

Devido à elevação da acidez Dornic, houve a presença da carga microbiana em quase toda a sua totalidade. Embora o LHO compõem-se de substâncias protetoras, elas não asseguram a contaminação, já que o crescimento microbiano é constituído da veiculação dos microrganismos (ALMEIDA, 2004) sendo que a boa qualidade de LHO se dá pelo controle higiênico sanitário da coleta e a manipulação do leite humano, a conservação sobre refrigeração adequada e as fases de processamento, pasteurização e estocagem.

Estudo apresentado por Castro (2006) sugere que a contaminação por coliformes pode ser bastante variável desde a unidade geográfica, quanto pela qualidade do treinamento das nutrizes sobre a coleta adequada do leite humano. Serafini et al., (2003), aponta também que a contaminação por coliformes pode ser proveniente do ambiente e relata ainda que a pasteurização pode ser comprometida por uma carga microbiana inicial elevada. Cabe ressaltar que a pasteurização elimina 95% da microbiota patogênica. Assim a pasteurização é um processo físico e a acidez um processo químico, e a temperatura não exerceria efeito sobre a ação da neutralidade da acidez (BRASIL, 2001).

Buscando estabelecer se há relação entre a acidez Dornic e o crescimento microbiano a 37° C, este estudo na Tabela 8 apresenta a comparação do grupo de microrganismo mesófilos associado a sua acidez Dornic juntamente com a frequência e a porcentagem que aparece, este grupo foi selecionado por ser o contaminante mais frequente em leite humano ordenado segundo Compendium of methods for the microbiological examination of foods (1984).

Tabela 8 – Distribuição da frequência das amostras analisadas com a Acidez °D e grupo Mesófilo

a °D	UFC/ ml Mesófilos	Nº de Amostra	Percentual de Amostras
3	$13 \times 10^0 - 0,01 \times 10^2$	01	3,4%
5	$78 \times 10^0 - 0,1 \times 10^1$	02	6,9%
8	$45 \times 10^0 - 0,05 \times 10^2$	08	27,6%
9	$45 \times 10^0 - 0,05 \times 10^2$	03	10,2%
10	$130 \times 10^0 - 1,8 \times 10^1$	01	3,4%
15	$30 \times 10^0 - 0,5 \times 10^1$	01	3,4%

Fonte: Dados do autor

Ao examinar os dados da acidez e comparar com as Tabelas 07 e 08, observa-se que houve uma variação entre acidez 9º a 15º Dornic e que a contagem microbiana mínima é de  $0,05 \times 10^{-2}$  UFC/ ml e máximo de  $130 \times 10^0$  UFC/ml para o grupo mesófilo. Observou-se no presente estudo que a acidez Dornic não constituiu um fator limitante para o crescimento bacteriano, pois em acidez  $\geq 8^\circ\text{D}$  houve crescimento microbiano, ou seja, em acidez 3ºD (3,4%) ( $13 \times 10^0 - 0,01 \times 10^2$ ), 5ºD (6,9%) ( $78 \times 10^0 - 0,1 \times 10^1$ ) e em 8ºD (27,6%) ( $45 \times 10^0 - 0,05 \times 10^2$ ), Norvak; Cordeiro (2007) apud Silvia; Almeida (2001) que relatam em seus estudos contagem microbiana elevada, e este era relacionada a contaminantes externos.

Os estudos de Norvak; Cordeiro (2007) e Rona et al., 2008 corroboram que a acidez no leite humano é resultado de ácido láctico da degradação da lactose por microrganismo. Bortolozzo, et al., (2004) apresentaram que o crescimento bacteriano com a elevação da acidez Dornic em amostra de leite humano cru e pasteurizado e congeladas há a possibilidade de alteração em sua estabilidade relacionada ao físico-químico do leite pasteurizado decorrente da manipulação.

Norvak; Cordeiro (2007) apud Luzeau et al., (2001) demonstrou que o leite humano cru ou pasteurizado e congelado, sofre lipólise elevando a

acidez e que em leite humano com valores normais de ácido láctico, esta alteração decorre da elevação de ácidos graxos livres produzidos pela lipase.

Neste estudo o grupo de microrganismos mesófilos permitiu uma visão sobre a carga microbiana existente nas amostras de leite humano ordenhado, as quais foram classificadas impróprias, os valores correspondentes da acidez  $\leq 8^{\circ}\text{D}$ , vêm confirmar com a literatura que a Acidez Dornic é um método eficaz para a avaliação indireta do crescimento microbiano no leite humano ordenhado.

## 6.2 Análises microbiológicas

Na análise estatística para coliformes foram descritas através de cada teste e na confirmação da presença de microrganismo, ou seja, na fase Presuntiva 24 amostras com valor mínimo de 3,60 e máximo de 240,00 (média de 70,31). O valor da variância foi de 5448,696 e o desvio padrão de 73,81. Na fase Confirmativa (VB) 13 amostras com valor mínimo de 3,60 e máximo de 93,00 (média de 16,69). O valor da variância foi de 586,484 e o desvio padrão de 24,22. Na fase Confirmativa (EC) 08 amostras com valor mínimo de 3,60 e máximo de 23,00 (média de 13,25). O valor da variância foi de 81,57 e o desvio padrão de 9,03.

Na resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001 do Ministério de Saúde, estabeleceu que os critérios para o controle microbiológico do leite humano, são a ausência tanto de coliformes a  $35^{\circ}\text{C}$ , a quantidade permitida de microrganismos aeróbios mesófilos é de até  $1 \times 10^2$  UFC/ml, como de *Staphylococcus* coagulase positiva em 01 ml de leite após a pasteurização (BRASIL, 2001). O LHO, não segue o conceito de lote como na indústria alimentícia. O mesmo não pode ser misturado, o que se torna obrigatória realizar a análise microbiológica de todos os frascos de leite humano. Devido ao grande volume de amostras, de meio de cultura e custos operacionais, torna-se inviável a procura da variedade de microrganismos patogênicos, a

partir desta premissa, verifica-se a necessidade de se utilizar o grupo de indicadores como realizado nesse trabalho Na Tabela 9 foi apresentada a quantificação de coliformes nas fases presuntivo e confirmativo VB e EC juntamente com a acidez Dornic.

Tabela 9 – Quantificação de coliformes na fase presuntivo, confirmativo VB e EC com a acidez °D.

Amostra	A °D	NMP g/ml - Coliformes		
		Presuntivo	Confirmativo VB	Confirmativo EC
4	08	23x10 <sup>0</sup>	--	--
5	08	9,2x10 <sup>0</sup>	--	--
6	10	23x10 <sup>0</sup>	--	--
7	05	240x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	--
10	08	21x10 <sup>0</sup>	--	21x10 <sup>0</sup>
11	03	21x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	--
12	05	3,6x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--
13	08	3,6x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--
14	09	3,6x10 <sup>0</sup>	--	--
15	15	160x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	23x10 <sup>0</sup>
16	08	93x10 <sup>0</sup>	3,6x10 <sup>0</sup>	--
17	09	93x10 <sup>0</sup>	--	--
19	08	93x10 <sup>0</sup>	--	--
20	08	240x10 <sup>0</sup>	93x10 <sup>0</sup>	--
21	08	93x10 <sup>0</sup>	--	3,6 x10 <sup>0</sup>
22	09	150x10 <sup>0</sup>	--	21 x10 <sup>0</sup>
23	08	93x10 <sup>0</sup>	--	21 x10 <sup>0</sup>
24	08	93x10 <sup>0</sup>	21 x10 <sup>0</sup>	--
25	08	15x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--
26	10	150x10 <sup>0</sup>	9,1 x10 <sup>0</sup>	9,2 x10 <sup>0</sup>
27	09	7,4x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--
28	03	14x10 <sup>0</sup>	--	3,6 x10 <sup>0</sup>
29	05	20x10 <sup>0</sup>	9,2 x10 <sup>0</sup>	--
30	05	15x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>

Fonte: Dados do autor.

A busca para redução de custos e um menor intervalo dos resultados a Rede Nacional de Banco de Leite, utiliza-se o teste alternativo que fornece resultados expressos em termos de presença ou ausência de coliformes, independente da quantificação. O fato de possuir um resultado presente para coliformes inviabiliza o produto como impróprio para o consumo. Nesse estudo a Tabela 10 apresenta os resultados positivos (presença) ou negativos (ausência) para coliformes.

Tabela 10 – Teste alternativo utilizado em banco de leite

<b>Coliformes</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>%</b>
Positivo	24	82,76
Negativo	05	17,24
Total	29	100

Fonte: Dados do autor

No presente trabalho a Tabela 10 apresentou 05 amostras com ausência de coliformes que corresponde a 17,24%. Porém 24 amostras (82,76%) apresentaram coliformes no teste presuntivo, destas 24 amostras, 13 (54,16%) delas apresentaram coliformes totais e 08 (33,33%) apresentaram coliformes fecais, entretanto 03 (12,5%) amostras apresentaram teste positivo para coliformes totais e fecais. Comparando este estudo com a Tabela 9 evidenciou que das 29 amostras analisadas, 24 foram positivas na prova presuntiva (meio Lauril Sulfato de Sódio). Dentre elas 13 amostras positivas na prova confirmativa para coliformes totais (meio Verde Brilhante) e na prova confirmativa para coliformes fecais (meio *E. coli*) 08 amostras foram positivas. Na Tabela 11 esse estudo quantificou a população de coliformes.

Tabela 11 – Quantificação de coliformes em NMP/ml nas amostras do leite humano

<b>Faixa de Contagem</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>%</b>
<1 (ausência)	05	17,24
01 — 10	05	17,24
10 — 100	14	48,27
100 — 1000	05	17,24
>1000	--	--

Fonte: Dados do autor

Estudo apresentado por Castro (2006) observou que em 60 amostras analisadas foram encontradas 75% das amostras positivas para coliformes totais. Para esse estudo, 24 (82,76%) amostras apresentaram coliformes, ou seja, destas 13 (54,16%) amostras apresentaram coliformes totais e 08 (33,33%) amostras que apresentaram coliformes fecais. Semelhante a esse estudo, Ramos (2006) descreve contaminação por coliformes em seu estudo, Serafini et al., (2003) obteve a presença de coliformes em 22,1% e Norvak; Almeida, (2002) das 343 amostras encontrou 31,2% de coliformes em leite humano ordenhado.

A avaliação das condições higiênico-sanitárias do leite humano realizado por Ponte; Ivasaki; Oliveira, (2003) em Banco de Leite Humano no Distrito Federal, foi encontrada a presença de 33,3% coliformes totais e 25,9% de coliformes termotolerantes que revelam a contaminação fecal. Já Bertozolo et., (2004) não evidenciou a presença de coliformes em seus estudos.

Norvak; Almeida, (2002) relatou que com 343 amostras de leite humano no Instituto Figueira Fernandes (IFF), que a população de coliformes encontrados foi de  $3,0 \times 10^0$  a  $3,0 \times 10^4$  NMP. Para este estudo foi encontrado no teste Presuntivo um valor mínimo de  $3,6 \times 10^0$  e valor máximo de  $240 \times 10^0$ , nos testes Confirmativos (VB) um valor mínimo de  $3,6 \times 10^0$  e valor máximo de  $93 \times 10^0$  e no teste (EC) um valor mínimo de  $3,6 \times 10^0$  e valor máximo de  $23 \times 10^0$ .

Serafini et al., (2003) em 194 amostras de leite humano ordenhado 70,4% apresentaram contaminação com microrganismo indicadores sendo 1,66 contaminadas por *Escherichia coli*. Rodrigues (2005) evidenciou em seus estudos em BLH no estado de São Paulo 20% de coliformes totais em suas amostras e 13,33% para coliformes de origem fecal inferior ao encontrado nesse estudo que corresponde a 33,33%.

Neste estudo em relação à *Escherichia coli*, a presença dessa bactéria em 33,33% nas amostras analisadas é um fator relevante, considerando a sua presença como indicador clássico de origem fecal, revela incidentes na manipulação do leite humano através das doadoras.

Rodrigues (2005) encontrou indicativo de 13,33% de *E. coli* em suas amostras. Castro (2006) constatou 50% de *E. coli* com uma população de 1 a 99 NMP/ml. Assis Neto et al., (2001) das 25 amostras analisadas 52% foram positivas para *E. coli* e a população foi de  $\leq 0,3$  a  $\leq 240$  NMP/ml, neste estudo foi evidenciado uma população de 3,6 a 23 NMP/ml.

Serafini et al., (2003) relata que o leite humano contaminado por coliformes pode ser procedente do ambiente. Segundo Rodrigues (2005) mesmo tendo encontrado indicativo de contaminação de origem fecal, as amostras em sua maioria apresentaram qualidade higiênico-sanitário adequada no leite humano coletado.

Segundo Ponte; Ivasaki; Oliveira, (2003) o aleitamento materno ao seio da mãe, não apresenta transferências de coliformes fecais, estes contaminantes são secundários e externos oriundo de manipulação de utensílios e equipamentos. A Tabela 12 foi apresenta o percentual dos microrganismos/grupo em relação à quantificação bacteriana, nas 29 amostras analisadas e as suas respectivas diluições.

Tabela 12 – Distribuição percentual da presença de microrganismos em amostras de leite humano

Microrganismo/Grupo	Distribuição percentual das amostras em função da quantificação e suas diluições seriadas		
	— 10 <sup>0</sup>	10 <sup>0</sup> — 10 <sup>-1</sup>	10 <sup>1</sup> — 10 <sup>-2</sup>
Psicrófilos	17,24%	03,45%	00%
Termófilos	27,59%	17,24%	03,45%
Mesófilos	55,17%	44,83%	10,34%
Fungos Filamentosos e Leveduriforme	41,38%	20,69%	00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	00%	00%	00%

Fonte: dados do autor.

Esse estudo não teve o intuito de classificar a microbiota do leite humano nos grupos de microrganismos enunciados e sim o de quantificar de acordo ao grupo microbiano ao qual pertence. O leite humano possui uma riqueza de nutriente na sua composição, porém as substâncias inibitórias estão presente apenas no leite humano cru recém-ordenado, as suas características intrínsecas como a atividade de água, pH próximo a neutralidade e extrínseca como a temperatura, associada a interação entre os microrganismos, produzem metabólicos que afetam a sobrevivência e a própria multiplicação fazendo com que este produto seja um excelente meio de cultura (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Almeida (1986) identificou a presença de psicrófilos 36,7% em suas amostra, Assis neto et al., (2001) verificou a contagem de  $6,0 \times 10^2$  na contagem de microrganismos psicrófilos. Norvak et al., (2001) encontrou 8,6%, (n=30) outro estudo do mesmo autor Norvak et al., (2008) evidenciou a presença 27,5% (n=40). Já para o microrganismo termófilos Norvak et al., (2008) 6,7%. Neste estudo o percentual de psicrófilos foi de 17,24% e para termófilo 27,59% (n=29).

A presença desses microrganismos em amostras de leite humano sugere contaminação secundária, com manipulação ou estocagem de

refrigeração inadequada, a disponibilidade de nutrientes no leite, a alta atividade de água e o pH próximo a neutralidade torna-o meio favorável ao crescimento bacteriano (ARCURI et al., 2006).

A contagem para bactérias mesófilas, estabelecido pela Resolução RDC nº 12/2001 é de  $1 \times 10^2$  UFC/ml, valor este utilizada no leite humano ordenhado cru, porém vale ressaltar que o leite humano ordenhado pasteurizado não há parâmetros estabelecidos pela Resolução na RDC nº 171/2006. Esta resolução retirou a contagem e a análise do microrganismo mesófilo realizado pelo banco de leite, o qual permanece apenas as análises físico-químico e a análise do grupo coliforme para avaliar a qualidade microbiológica do leite segundo Nobre et al., (2015).

No estudo de mesófilos Assis Neto et al., (2001) evidenciou 96%, desse microrganismo em suas análises, resultado semelhante ao de Scarso, (2008) 98,6%, de Rodrigues (2005) de 96,6% e Norvak, (2007) encontrou 96% de mesófilos em suas amostras, outro estudo de Norvak (2008) identificou 80%. Nobre et al., (2015) identificou 62,12%. Neste estudo foram encontrados 55,17% de mesofilo superior ao encontrado por Pontes; Ivasaki; Oliveira, (2003) que identificou 48,2% e Castro, (2006) 34,48%.

A detecção de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis em amostras de leite humano superior ao valor de referência evidencia contaminação ocasionada à ausência de prática na manipulação. Pontes; Ivasaki; Oliveira, (2003) após analisarem suas amostras concluiu que houve a ruptura das Boas Práticas de Manipulação durante o processamento do leite humano. Segundo Nobre et al., (2015) as bactérias mesófilas funciona como indicador da qualidade sanitária do leite, para Norvak; Cordeiro (2007) a presença desse microrganismo estão relacionadas as técnicas inadequada de coleta, higiene precária em relação a doadoras e dos utensílios e manutenção do leite fora da cadeira de frio. GALHARDO et al., (2002) relata que o crescimento bacteriano produz fermentação e acidificação do leite humano levando assim a redução nutricional e imunológico do produto desqualificando a utilização.

Quanto a presença de *Staphylococcus aureus* Almeida et al., (1998) detectou 96% em seus estudos. Castro (2006) encontrou 78,57% (n=60) no leite humano analisado. Serafini et al. (2003) em seus estudos identificou 7,35% (n=10). Assis Neto et al (2001) relatou a presença de 32% e Pontes; Iwasaki; Oliveira, (2003) detectou 44,4%. Já Rodrigues (2005) identificou 35% e Norvak (2008) citou 30%. Almeida et al., (2012) relataram 12% (n=6). Para este estudo não houve a presença de *Staphylococcus aureus*.

Almeida (1986) encontrou uma prevalência de fungos filamentosos e leveduriformes em 69,4% de suas amostras. Serafini et al., (2003) observou a presença em 31,6% de suas amostras. Já Scarso (2008) encontrou 56%, já Norvak (2008) identificou 6,7%, Sousa et.al (2010) encontrou 2,23x10 UFC/ml no leite após o congelamento e 1,94x10 UFC/ml no leite após a pasteurização. Neste estudo foram identificados 41,38%.

Esses microrganismos mostram tolerância maior para pH entre 6,5 a 7,5 pH, já que os fungos filamentosos multiplicam-se em pH mais baixos que as leveduriformes Franco; Landgraf, (2005), neste estudo o pH para este microrganismo ficou no valor mínimo de 6,74 a 7,12 de pH. As leveduras também causam alterações na qualidade do leite, através da ação sobre a lactose que afeta as enzimas desses microrganismos entre elas as proteases e as lipases, resultando na produção de CO<sub>2</sub> que origina um mau odor pelo processo fermentativo (JAY, 2005).

Norvak, et al., (2002) constataram em seus estudos que os esporos de fungos contidos em alimentos podem transpassar das doadoras pelas mãos para o LHO, a incidência de fungos filamentosos e leveduriforme em leite humano ordenhado tem relação direta com hábitos, fato de extrema relevância para a manipulação do controle da assepsia e a coleta do LHO. Os dados encontrados neste estudo sugerem provavelmente, que não houve uma assepsia adequada das mãos e/ou dos mamilos da doadora durante a manipulação da coleta do leite humano, pois os fungos pertencentes ao ambiente podem ser transferidos para as mãos e conseqüentemente ao leite ordenhado.

Tabela 13 – Correlação entre acidez ° Dornic e o microrganismo mesófilo

<b>Coefficiente de Correlação de Pearson</b>		<b>A ° Dornic</b>	<b>Mesófilos</b>
A ° Dornic	Pearson Correlation	1	.148
	Sig. (2-tailed)	..	.442
	N	29	29
Mesófilos	Pearson Correlation	.148	1
	Sig. (2-tailed)	.442	..
	N	29	29

Fonte: Dados do autor.

O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado em todos os grupos de microrganismo estudados neste trabalho, porém para o grupo de mesófilo foi único que apresentou correlação com acidez ° Dornic, devido à ausência de correlação nos demais grupos de microrganismo, não houve a apresentação dos dados. A análise estatística descritiva para o grupo de mesófilo corresponde 00 o valor mínimo e o máximo de 130 com a média de 16,55 e o desvio padrão de 28.62359 seguido da variância de 819.310, já na Tabela 13 apresenta os resultados do coeficiente de correlação de Pearson entre a variável acidez ° Dornic e o microrganismo de mesófilo, este grupo além de apresentar baixa correção, há evidências de estudo publicado em meio científico, sendo que os mesmo foram utilizados com a finalidade de comparação dos dados evidenciados neste estudo.

A correlação entre as variáveis da acidez ° Dornic e o microrganismo mesófilo foram de R - 0,02261. O presente estudo analisou 29 amostras, das quais 55,17% houve a presença do microrganismo, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson através do programa SPSS versão 19 para Windows. Conforme apresentado na figura 10.

Figura 10- Correlação Linear da acidez ° Dornic e mesófilos

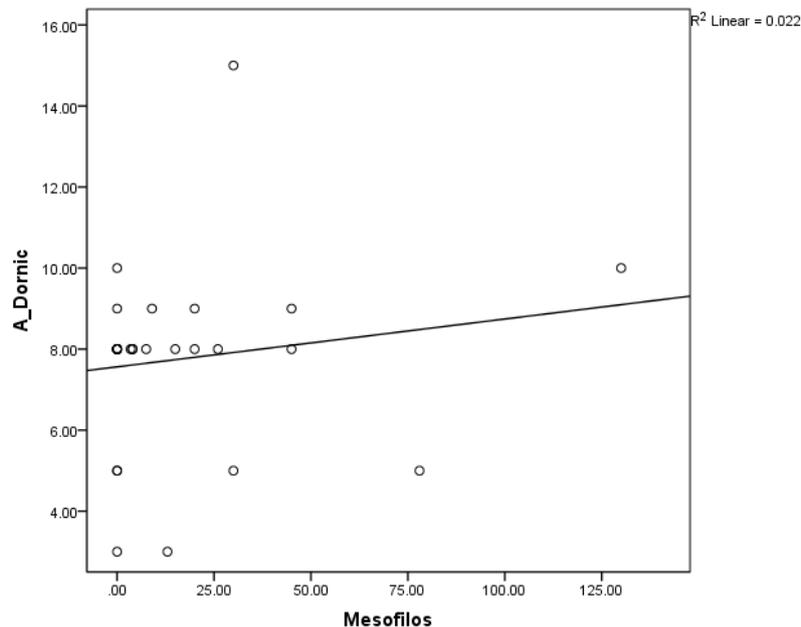
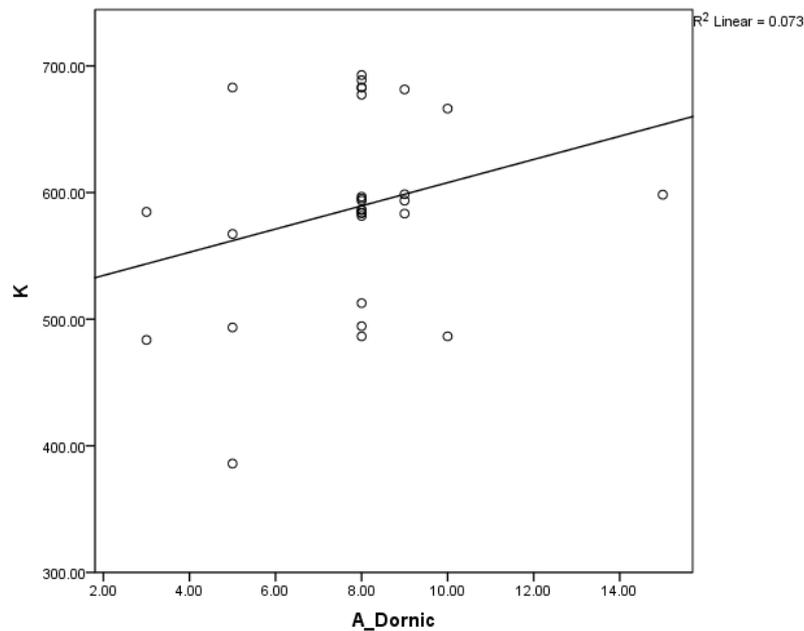


Tabela 14 – Correlação entre acidez °Dornic, pH e K das amostras de leite humano

		A ° Dornic	pH	K
A ° Dornic	Pearson Correlation	1	.075	.270
	Sig. (2-tailed)		.700	.157
	N	29	29	29
pH	Pearson Correlation	.075	1	-.256
	Sig. (2-tailed)	.700		.180
	N	29	29	29
K	Pearson Correlation	.270	-.256	1
	Sig. (2-tailed)	.157	.180	
	N	29	29	29

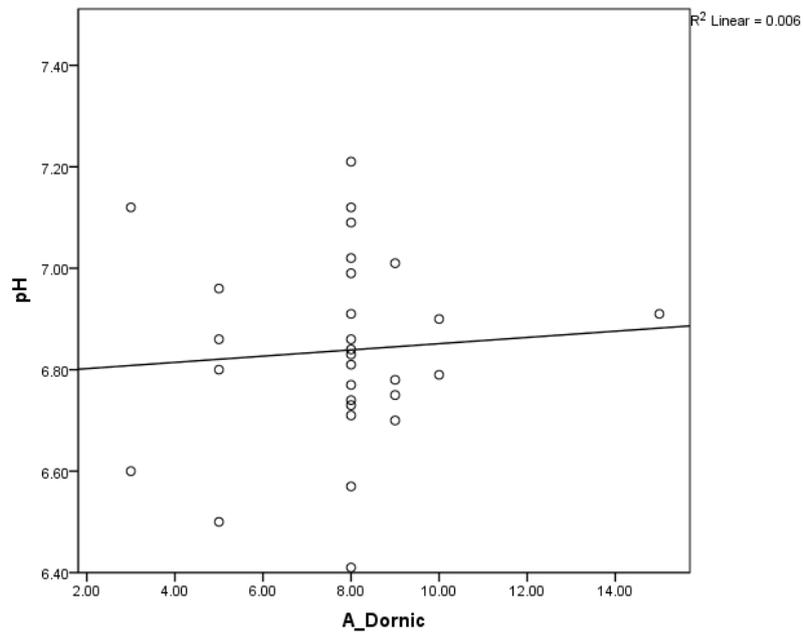
Fonte: Dados do autor.

Figura 11- Correlação Linear da acidez ° Dornic e K.



Fonte: Dados do autor.

Figura 12 - Correlação Linear da acidez ° Dornic e pH.



Fonte: Dados do autor.

## 7. CONSIDERAÇÕES

O objetivo dessa dissertação foi alcançado, foram realizadas as análises microbiológicas do leite humano e a quantificação dos microrganismos, simultaneamente com as análises físico-química de K (teor energético), pH e acidez ° Dornic. Todos os resultados foram aplicados para análises estatística e descritiva através do programa de SPSS Windows versão 19. Apresentam-se os comentários sobre as variáveis apresentada neste estudo.

Para a variável K (teor energético) neste estudo houve consonância com a literatura que quanto maior o valor energético, menor o pH e maior a acidez, neste estudo 29,68% (n=6) apresentaram crescimento microbiano com o valor de K e inferior ao de pH e a acidez elevada entre 9, 10 e 15° Dornic, e entre ela 6,73% (n=2) não houve crescimento bacteriano, também não foi observado o crescimento microbiano em 13,79% (n=4) com a acidez correspondente 8° Dornic uma hipótese para esse fenômeno é que o leite humano sofre lipólise elevada acidez, já para 41,37% (n=12) com acidez correspondente 8° Dornic e 25,58% (n=8) com acidez <8° Dornic houve crescimento da microbiota, o que reintegra a atenção para a contaminação em função da manipulação.

Neste estudo a variável de pH apresentou uma variação concordante aos dados da literatura com a média de 6,8 pH. Por ter uma instabilidade em seus valores precisos a Rede Brasileira de Banco de Leite não preconiza o pH para a mensuração da acidez do leite humano, pois os ácidos pré-formados não são obtidos através de pH devido a baixa concentração de íons livres. O leite humano possui elevada atividade de água, uma composição química e fatores naturais de interação da microbiota, associado ao fator extrínseco como a temperatura pode alterar o fator de pH. Observou-se neste estudo que não houve diminuição de pH, o qual apresentou um valor mínimo de 6,05 e máximo de 7,21 sugerindo que ao houve reação lipolítica e proteolítica que liberasse ácidos graxos e aminoácido confirmando a hipótese de da variável (K). Porém em relação à

acidez elevada a amostra de número (26) apresentou o pH de 6,90 e a acidez  $10^{\circ}$  Dornic com a presença de  $130 \times 100^0$  UFC/ml, a hipótese para este evento foi que houve a desestabilização da caseína tornando o cálcio menos disponível, contribuindo ao crescimento microbiano, este fenômeno está relacionado com a conservação inadequada do leite humano após a coleta.

Para acidez  $^{\circ}$  Dornic neste estudo foi evidenciado que houve uma variação da acidez de 03 a  $15^{\circ}$  Dornic, com a média de  $7,79^{\circ}$  Dornic observou-se também que o leite humano apresentou valor de acidez  $\leq 8^{\circ}$  Dornic elevada quantidade de microrganismo do que os que apresentaram  $\geq 8^{\circ}$  Dornic cabem também citar que as amostras de número (6) com acidez de  $10^{\circ}$  Dornic e a amostra número (22) com acidez de  $9^{\circ}$  Dornic apresentaram ausência de microrganismos do tipo mesófilos mais comum no leite humano, e a amostra de número (15) com acidez de  $15^{\circ}$  Dornic apresentou baixa quantidade de microrganismo  $30 \times 10^0$  UFC/ ml.

A alta acidez e a ausência de microrganismo sugeriram oxidação lipídica influenciada pela temperatura do armazenamento. Já para a acidez  $\geq 8$  A alta acidez e a ausência de microrganismo sugeriram oxidação lipídica influenciada pela temperatura do armazenamento.

Foi observado que em 13,79% (n=4) a ausência de microrganismo na acidez de  $8^{\circ}$  Dornic, contudo o leite humano foi considerado impróprio para o consumo, as mesmas descartadas, deduz-se que banco de leite utiliza uma margem de segurança na distribuição do leite humano, levando em consideração à clientela receptora, entre outros dados relevantes como a sensibilidade do recém-nascido, a excepcionalidade dos prematuros, a susceptibilidade a infecções, o desfavorecimento imunológico, o retardo na maturação do sistema imune e do aparelho intestinal, o leite humano com sobrecargas ácidas e básicas resultando em acidose ou alcalose e a sua utilização pode vir a causar enterocolite necrosante no neonato prematuro.

Neste estudo para a análise microbiológica do grupo de coliformes 17,24% (n=5) apresentou a ausência do microrganismo, porém 82,76%

(n=24) comprovaram a presença de coliforme na fase presuntiva com o valor mínimo de 3,60 e máximo de 240,00 NMP/ml, destas 24 amostras, 54,16% (n=13) apresentaram coliformes totais, com valor mínimo de 3,60 e máximo de 93,00 NMP/ml e 33,33% (n=8) apresentaram coliformes fecais, com valor mínimo de 3,60 e máximo de 23,00 NMP/ml, no entanto 12,5% (n=03) apresentaram teste positivo para coliformes totais e fecais.

A detecção de microrganismos coliformes nesse estudo indica que algum ponto no caminho percorrido pelo leite humano ordenhado, houve a quebra das boas práticas de procedimento, outro precedente da elevação da quantidade da microbiota neste estudo sugere que esteja relacionada com as técnicas inadequadas de coleta, higiene precária e uso de utensílios na manipulação do leite humano fora da cadeia a frio. Dentro deste contexto destaca-se que a presença de microrganismos do grupo coliformes indica à inobservância dos procedimentos higiênico-sanitários recomendados, o que comprova através do teste confirmativo EC, na presença dessa bactéria em 33,33% das amostras analisadas, é um fator relevante, considerando a sua presença como indicador clássico de origem fecal, revelado assim incidente na manipulação do leite humano.

A presença dos microrganismos psicrófilos e termófilos em amostras de leite humano sugere contaminação secundária, com manipulação ou estocagem de refrigeração inadequada. Já para a detecção de microrganismos mesófilos nas amostras de leite humano evidencia a contaminação ocasionada pela ruptura das boas práticas de manipulação, o grupo de microrganismo mesófilo atua como indicador da qualidade sanitária do leite, a sua presença relaciona-se com a técnica inadequada de coleta, higiene precária e o uso utensílios na manipulação do leite humano fora da cadeia a frio. O crescimento microbiano do mesófilo produz fermentação e acidificação do leite humano, desqualificando a utilização e levando, portanto a redução nutricional e imunológica do produto.

Os *Staphylococcus* são bactérias mesófilas com crescimento ótimo a 37°C e faixa entre 07 a 47,8°C, e apresenta crescimento em 04 a 9,8 pH,

habita a cavidade nasal, pele e a pele do mamilo, a presença desse microrganismo no leite humano é indicativo de contaminante externo, sugerido o procedente de manipuladores, utensílios e equipamentos, para este estudo não houve crescimento do microrganismo.

A incidência de fungos filamentosos e leveduriforme pertencentes ao ambiente podem ser transferidas para as mãos e conseqüentemente ao leite humano ordenhado, fato de extrema relevância para a manipulação do controle da assepsia e a coleta do leite humano ordenhado, para este estudo indica que não houve uma assepsia adequada das mãos e/ou dos mamilos da doadora durante a manipulação da coleta do leite humano.

A inferência do coeficiente de correlação de Pearson na quantidade amostral ( $n=29$ ) não forneceu estimativas fidedignas da correlação linear entre as várias observadas, ou seja, a conclusão realizada a partir de uma quantidade reduzida de observações deve ser interpretada com bastante cautela, isso porque amostras pequenas não fornecem estimativas confiáveis de parâmetros populacionais.

## 8. CONCLUSÃO

O leite humano ordenhado fornecido pelo banco de leite de São Carlos segue o padronizado pela Rede Nacional de Banco de Leite Humano no Brasil e a Resolução RDC nº 171/2006 sendo que as análises do controle da qualidade do leite humano em banco de leite são físico-químicas através da acidez em ° Dornic, a análise da qualidade microbiológica por meio do microrganismo coliforme, ambas as análises apresentam baixa operacionalidade e custo reduzido. Neste estudo por intermédio das análises físico – químicas (acidez ° Dornic, pH e K), a quantificação através da temperatura dos grupos de microrganismos (Psicrófilos, Mesófilos, Termófilos, *Staphylococcus* spp., Fungos filamentosos e leveduriformes) e o teste Presuntivo e Confirmativo para Coliformes Totais e Fecais, realizada no leite humano ordenhado classificado como impróprio para clientela receptora conclui que o banco de leite de São Carlos distribui um leite humano com qualidade microbiológica dentro dos padrões permitido pela Rede Nacional de Banco de Leite Humano e a legislação vigente. Porém há a necessidade de uma educação permanente para diminuir da deficiência das boas práticas de manipulação do leite humano ordenhado, o qual representa o descarte nas etapas iniciais, pois se atribui a coleta grande relevância, na qualidade higiênica sanitária de leite humano ordenhado, tendo em vista que não exerce monitoramento absoluto deste, especialmente na coleta externa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A.G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite humano**. Viçosa. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1986. 68p.

ALMEIDA J. A. G. **A evolução dos bancos de leite no Brasil [vídeo cassete]**. Rio de Janeiro: Núcleo de Vídeo do Centro de Informação Científica e Tecnológica da Fundação Oswaldo Cruz; 1992.

ALMEIDA J. A. G., NOVAK F. R. **Banco de Leite Humano: fundamentos e técnicas**. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Nutrição e Metabolismo Infantil; 1994 julho; Porto Alegre, Brasil. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Pediatria;1994.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, I. S. **Estudo da ocorrência de Staphylococcus aureus em amostras de leite humano ordenhado**. In: I Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano. 1998. p. 8-12.

ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação: Um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1999.

ALMEIDA J. A. G., MAIA P. R. S., NOVAK F. R. **Os bancos de leite humano como suporte para a redução da mortalidade infantil: a experiência brasileira**. In: Anais do II Congresso Uruguayo de Lactancia Materna; 2004 setembro 1-4; Montevideo, Uruguay. Montevideo: Sociedad Uruguaya de Pediatria; 2004. Disponível em: <http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/2culm/2culm.htm> acesso mar 2016.

ALMEIDA, V. M.; NASCIMENTO, A. R.; CHAVES, N. P.; ALMEIDA, V. M.; BEZERRA, D. C.; ALVES, L. M. C. **Diagnóstico das condições microbiológicas e higiênicas de um banco de leite humano**. Alim. Nutr., Araraquara, v. 23, n. 1, p. 95-99, jan./mar. 2012.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. **Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas**. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARCURI, E. F. et al. **Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado**. Ciência Rural, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ASSIS NETO, et al. **Perfil microbiológico do leite materno do Banco da Maternidade Evangelina Rosa, Teresina (Piauí)**. Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment, v. 19, n. 1, p. 75-84, 2001.

Bacteriological Analytical Manual 2010.  
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm> acessado 20/05/2016.

BORGO, L. A. et al., **Avaliação do funcionamento e identificação de pontos críticos de controle, em bancos de leite humano do Distrito Federal.** Hig. Aliment., v.19, n. 129, p. 43-46, março, 2005.

BORTOZOLO, E. F. Q., PIETROSK, G., BAGGIO, R., CANDIDO, L. M. B. **Padrão microbiológico e sanitário do leite humano processado em banco de leite.** Revista Higiene Alimentar. 2004; 12:85-8.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano.** 4ª Ed. Brasília, DF, Ministério da Saúde; 2001. Série A, n.117, 48 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução RDC nº 12/2001 – Regulamento técnico sobre Padrões microbiológicos para alimentos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 de jan. de 2001.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Diário Oficial da União, Brasília (DF);, 2006.

BRASIL, ANVISA. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos.** 160p. – Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2008. 160p.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite.** Juiz de Fora: Embrapa/Tortuga, 1998. 64 e 65 p.

BRITTO, M. G. M.; BARBOSA, L. L.; MERCHÁN-HAMANN, E. **Avaliação sanitária dos bancos de leite humano na rede hospitalar do Distrito Federal.** 1999-2000. Rev. Saúde Dist. Fed., v. 13, n. 3/4, p. 17-28, jul./dez. 2002.

CARDOSO, A. L. S. P. *et al.* **Pesquisa de Salmonellas sp, coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango.** Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, 67 v. nº 1, 2000.

CARROLL L.; DAVIES D. P.; OSMAN M.; MCNEISH A. **Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units.**Lancet 1979;2:732-3

CARVALHO, M. R.; TAMEZ R. N. **Amamentação bases científica.** 2ª edição – Rio de Janeiro – editora Guanabara Koogan, 2005 – p. 57 a 85.

CASTRO, M. R. C C. **Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em Banco de Leite Humano** [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP; 2006.

CAVALCANTE, J. L. P. et al. **Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado.** CiencTecnolAliment, v. 25, n. 1, p. 103-8, 2005.

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

DELAZARI, I. **Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves.** In: Anais VIII Semana Acadêmica Veterinária: São Paulo, 1998. p.71-77.

DIEHL, A. A. **Pesquisa em ciências sociais aplicadas: métodos e técnicas.** São Paulo: Prentice Hall, 2004.

FIOCRUZ. **Portal da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Iniciativa e missão.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=362&sid=364>>. Acessado em 22/01/2015.

FIOCRUZ. **Banco de leite humano: Funcionamento, prevenção e controle de riscos.** <http://www.fiocruz.br/redeblh/media/blhanv2008.pdf> acessado em 17/10/2015.

FONSECA, J. J. S. **Metodologia da pesquisa científica.** Fortaleza: UEC, 2002. Apostila.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. **São Paulo: Atheneu, 2005.**

FRAZIER, N.C. **Microbiologia de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.

GALHARDO, A. L. M.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. **Acidez Dornic como parâmetro de qualidade, em bancos de leite humano.** Hig. Aliment.,16(100): 16-27, set. 2002.

GALVÃO, M. T.G.; VASCONCELOS, S. G.; PAIVA, S. S. **Mulheres doadoras de leite humano.** Ver. Acta Paul Enferm 2006; 19 (2): 157-61.

GERHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. **Métodos de pesquisa/ coordenado pela Universidade Aberta do Brasil – UAB/UFRGS e pelo Curso de Graduação Tecnológica – Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural da SEAD/UFRGS. – Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009.**

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa.** 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007.

GIUGLIANI E. R. J.,**Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: tecnologia para exportar.** *Jornal de Pediatria.* (Rio J). 2002 Vol. 78, nº 03, p. 183 a 184.

GUEDES, T. A.; ACORSI, C. R. L.; MARTINS, A. B. T.; JANEIRO, V. **Estatística descritiva. Projeto de ensino – aprender fazendo estatística.**[s. l., [2005]. Disponível em: <[http://www.des.uem.br/uploads/arquivos\\_professor/0221095505.pdf](http://www.des.uem.br/uploads/arquivos_professor/0221095505.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2016.

JAY, J. M. **Microbiologia dos Alimentos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LIMA, T.M.; OSORIO, M. M. **Perfil e fatores associados ao aleitamento materno em crianças menores de 25 meses da Região Nordeste do Brasil.** Rev. Brás. de Saúde Materno Infantil, Recife, v. 3, n. 3, p. 305-314, jul./set., 2003.

MAIA, P. R. S., et al. **Bases conceituais para uma estratégia de gestão: o caso da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano.** Cad. Saúde Pública, Dez 2004, vol.20, nº. 06, p.1700-1708.

MAIA, P. R. S., et al . **Rede Nacional de Bancos de Leite Humano: gênese e evolução.** Rev. Bras. Saúde Mater. Infant., Recife , v. 6,n. 3,p. 285-292,Sept. 2006. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-38292006000300004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292006000300004&lng=en&nrm=iso)>. access on 15 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-38292006000300004>.

NETO M. T. **Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo a sua prevenção.** Acta Pediatr. Port. 2006; 1 (37): 23-6.

NEVES, L. S. et al. **Doação de leite humano: dificuldades e fatores limitantes.** Mundo Saúde, v. 35, n. 2, p. 156-61, 2011.

NEWMAN, J. **How Breast Milk Protects Newborns - Como o leite materno protege os recém-nascidos.** Scientific American, v. 4, p. 76-79, 1995.

NOBRE G.C., et al., **Análise microbiológica do leite humano cru no banco de leite de um hospital de Araguaína –TO.** Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v8, nº2, Pub.8, Agosto de 2015.

NOVAK, FR.et al. **Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado.** Cad. Saúde Pública [online]. 2001, vol.17, n.3, pp.713-717. ISSN 1678-4464. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000300026>.

NOVAK FR, ALMEIDA J.A. **Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado.** Jornal de Pediatria (Rio J). 2002 Vol. 78, nº 03, p.193 a 196.

NOVAK FR, ALMEIDA J.A., SANTOS M.J., WANKE B. **Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais.** *Jornal de Pediatria (Rio J)* 2002 Vol. 78, nº 03, p.197a 201.

NOVAK, FR. CORDEIRO, DM. **The Correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidith in expressed human breastmilk.** *Jornal de Pediatria (Rio J)*. 2007; Vol. 83, nº 01, p.87 a 91.

NOVAK, FR. et al . **Análise sensorial do leite humano ordenhado e sua carga microbiana.** *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v. 84, n. 2, Apr. 2008.

PASSANHA, A. et al. **Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias.** *Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano*, v. 20, n. 2, p. 351-360, 2010.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.N. **Microbiologia, vol1 e 2**, Ed. McGraw-Hill, São Paulo (SP), 1981.

PINHEIRO, R. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no Município de Piracicaba - SP.** 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

POLIT, D. F.; BECK, C. T.; HUNGLER, B. P. **Fundamentos de pesquisa em enfermagem: métodos, avaliação e utilização.** Trad. de Ana Thorell. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

PONTES, M. R. A.; IVASAKI, 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, nº107, p 43-48, 2003.

RATTI R. P., SOUSA C. P. **MeticillinresistantStaphylococcus aureus (MRSA) andnosocomialinfections.** *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada*, v. 30, p. 9-15, 2009.

RAUPP, R. M., MONTEIRO, D. L. M.; SOUZA, K. S., ALMEIDA, J. A. G. **Refletindo sobre os híbridos: aleitamento materno e gravidez na adolescência.** *Adolesc Saúde*. 2011; 8 (3): 35-42.

REBERTE, L. M., **Celebrando a Vida - nosso compromisso com a promoção da saúde da gestante**, Cartilha Educativa, Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em [www.ee.usp.br/doc/celebrando\\_a\\_vida.pdf](http://www.ee.usp.br/doc/celebrando_a_vida.pdf). Acesso em: 10 out. 2013.

REDEBLH. REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO **Banco de Leite Humano - Localização e Relatórios** <http://www.redeblh.fiocruz.br/...htm?tpl=home> acessado em 03/mar/2016.

REDEBLH. REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO **Centro de Referência Nacional** <http://www.redeblh.fiocruz.br/...htm?tpl=home> acessado em 03/mar/2016.

REDEBLH. REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO **História** <http://www.redeblh.fiocruz.br/...htm?tpl=home> acessado em 03/mar/2016.

REDEBLH. REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO **Reconhecimento Internacional** <http://www.redeblh.fiocruz.br/...htm?tpl=home> acessado em 03/mar/2016.

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.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RONA, M. S. S. et al. **Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nas determinações de acidez, cálcio, proteínas e lipídeos de leite de doadoras de bancos de leite humano.** Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, v. 8, n. 3, p. 257-263, jul./set., 2008.

SCARSO, I. S., **Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em Leite Humano: aspectos microbiológicos e nutricionais. 83 p (Dissertação de Mestrado)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

SERAFINI, A. B. et al . **Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite.** Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 37,n. 6, Dec. 2003.

SILVA, E. R., ABDALLAH, V. O., OLIVEIRA, A. M. M. **Qualidade microbiológica do leite humano ordenhado no domicílio: eficácia de uma ação educativa.** In 5ª Semana Acadêmica. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

SILVA, V. G. **Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas.** Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos.** Brasília: EMBRAPA, 1995.159 p.

SOUSA C. P. **Mecanismos de patogenicidade de células bacterianas: resistência a agentes antimicrobianos.** Laes&Haes, São Paulo, v. 171, p. 130-142, 2008.

SOUSA C. P. **The Impact of Food Manufacturing Practices on Food borne Diseases. Brazilian Archives of Biology and Technology,** v. 51, p. 815-823, 2008.

SOUSA C. P., DUBREUIL JD. **Escherichia coli heat stable toxin 1 (EAST1) as a Shuttle Molecule between Escherichia coli pathotypes, Salmonella spp. and Klebsiella pneumoniae.** Trends in Microbiology, Espanha, v. 2, p. 21-29, 2006.

SOUSA, P. P. R.; SILVA, J. A. **Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência.** Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo, v. 69, n. 1, 2010 . Available from <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-9852010000100002&lng=en&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-9852010000100002&lng=en&nrm=iso)>.access on 15 June. 2016.

SOUZA L., M., B., M. **Do leite fraco à biologia da excepcionalidade as múltiplas faces da mesma moeda** [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ; 2003.

SPEEK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 2th ed. Washington, D.C: American Public Health Association; 1984.

TRIVIÑOS, A. N. S. **Introdução à pesquisa em ciências sociais: a pesquisa qualitativa em educação.** São Paulo: Atlas, 1987.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.**3 ed. Washington: American Public Health Association, 1996. 873 p.

VASCONCELOS, E. C. et al. **Microbial status of the lamb carcass and the meat treated with acetic acid, vacuum packaged and aging for 48 days.** Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 22 v, n. 3, 2002.

VIECZOREK, A. L. **Avaliação dos Bancos de Leite Humano do Paraná.** 2010.160 f. Dissertação [Mestrado em Enfermagem] – Universidade Federal do Estado do Paraná2010.

WORLD HEALTH ORGANISATION - STAFF UNICEF. **Global strategy for infant and young child feeding.**2003. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/924159120X.pdf> - acessado em 17/10/2013.

## ANEXOS

## ANEXO 01 – Folha de Aprovação da Comissão de Ética (duas folhas).

<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS/UFSCAR</b>										
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>										
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>										
<b>Título da Pesquisa:</b> QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO CRU E PASTEURIZADO EM UM BANCO DE LEITE DA CIDADE DE SÃO CARLOS										
<b>Pesquisador:</b> Claudete de Oliveira										
<b>Área Temática:</b>										
<b>Versão:</b> 1										
<b>CAAE:</b> 44069315.0.0000.5504										
<b>Instituição Proponente:</b> Programa de Pós-Graduação em Enfermagem										
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio										
<b>DADOS DO PARECER</b>										
<b>Número do Parecer:</b> 1.088.916										
<b>Data da Relatoria:</b> 12/05/2015										
<b>Apresentação do Projeto:</b>										
Adequada.										
<b>Objetivo da Pesquisa:</b>										
Avaliar a qualidade do leite humano em banco de leite no município de São Carlos. Realizar o levantamento de aspectos relacionados com a incidência microbiana em amostras de leite humano ordenhado cru e pasteurizado manuseado em banco de leite humano em São Carlos/SP o qual encontra-se impróprio para a clientela receptora.										
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>										
Não há indicação de sujeitos. A presente pesquisa utilizará o leite humano o qual caracteriza-se como um produto impróprio (descartado) para a clientela receptora, pois o mesmo já passou pelo Banco de Leite o qual fez o processo da captação, do processamento e da pasteurização e só após os resultados da Acidez Dornic e o teste positivo microbiológico para o grupo de coliformes, processo este que atende com rigor as normas da legislação vigente, tem destino final para consumo e/ou descarte. Não haverá a identificação e nenhum contato previu direto ou indireto com as doadoras do leite humano. A pesquisa deve contribuir com a qualificação da assistência de enfermagem no Banco de Leite Humano a qual poderá delinear intervenções e										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Endereço:</b> WASHINGTON LUIZ KM 235</td> <td style="padding: 2px;"><b>CEP:</b> 13.565-905</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Bairro:</b> JARDIM GUANABARA</td> <td style="padding: 2px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>UF:</b> SP</td> <td style="padding: 2px;"><b>Município:</b> SAO CARLOS</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Telefone:</b> (16)3351-9683</td> <td style="padding: 2px;"><b>E-mail:</b> cephumanos@ufscar.br</td> </tr> </table>			<b>Endereço:</b> WASHINGTON LUIZ KM 235	<b>CEP:</b> 13.565-905	<b>Bairro:</b> JARDIM GUANABARA		<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO CARLOS	<b>Telefone:</b> (16)3351-9683	<b>E-mail:</b> cephumanos@ufscar.br
<b>Endereço:</b> WASHINGTON LUIZ KM 235	<b>CEP:</b> 13.565-905									
<b>Bairro:</b> JARDIM GUANABARA										
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO CARLOS									
<b>Telefone:</b> (16)3351-9683	<b>E-mail:</b> cephumanos@ufscar.br									
Página 01 de 02 										

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS/UFSCAR



Continuação do Parecer: 1.088.916

orientação as doadoras ali cadastradas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa analisa leite humano em banco de tecidos, sem identificar a origem (doadores).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto deve ser aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SAO CARLOS, 01 de Junho de 2015

Assinado por:

Ricardo Carneiro Borra  
(Coordenador)

Henrique Afonso de André Sobrinho  
Secretário Executivo  
ProPq/UFSCar

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO 02 - Parecer da Santa Casa de São Carlos com Aprovação  
do Projeto de Pesquisa.

**Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos  
Comissão de Ética Médica**

Rua Paulino Botelho de Abreu Sampaio, 573 - Cep:13561-060 - Tel: (16) 3509-1279

Ofício 20.15

São Carlos, 16 de Junho de 2.015.

**Ilma. Sra .**

**Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
Coordenadora do Projeto**

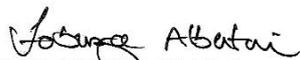
**Ilmo. Sr.**

**Antonio Valério Morillas Junior  
Provedor da ISCMSC**

REF: Projeto - Qualidade Microbiológica do leite humano cru e  
pasteurizado em um banco de leite da cidade de São Carlos

Em atenção ao projeto citado acima temos a informar as V.Sas que o  
mesmo foi analisado pela comissão de ética médica, não havendo impedimento  
ético para a realização do projeto referenciado.

Atenciosamente,



Dr. Fabrizio Margarido Albertini

**Presidente da Comissão de Ética Médica**

Recebido em:

16/06/15  


Provedor da Santa Casa S. Carlos

Oficos

## APÊNDICES

### APÊNDICE 01 - Tabela 1 – Número Mais Provável (NMP)/ml.

Tabela 1 – Número Mais Provável por grama ou ml. Para séries de 03 tubos inócuos de 0.1; 0.01; 0.001 e respectivos intervalos de confiança 95%.

Número de Tubos Positivo			NMP/ g ou ml	Intervalo de confiança de 95%	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	--	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	94
3	0	2	64	17	94
3	1	0	43	9	110
3	1	1	72	17	180
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	--

Fonte: Bacteriological Analytical Manual 2010.

## APÊNDICE 02

Tabela 2 – Análise físico-química e quantificação do grupo microbiano.

Amostra	Análises físico-químicas			UFC/ml															NMP/ml			
	a °D	pH	K	Psicrófilos			Mesófilos			Termófilos			Fungos filamentosos			Staphylococcus spp			Coliformes			
				10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Presuntivo	VB	EC	
1	8	6,91	595,20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	8	6,99	584,07	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3	8	7,02	586,17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
4	8	6,77	586,17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	23x10 <sup>0</sup>	--	--	--
5	8	6,71	494,50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9,2x10 <sup>0</sup>	--	--	--
6	10	6,79	486,47	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	23x10 <sup>0</sup>	--	--	--
7	5	6,96	493,46	1,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	240x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	--	--
8	8	7,12	581,46	6	0,1	--	45	0,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	8	7,21	486,47	--	--	--	--	--	--	0,5	--	--	1,5	--	--	--	--	--	21x10 <sup>0</sup>	--	21x10 <sup>0</sup>	--
11	3	6,60	584,71	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	21x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	--	--
12	5	6,05	682,94	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,6x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--	--
13	8	6,73	583,63	--	--	--	15	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,6x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--	--
14	9	6,75	593,64	5	--	--	20	0,25	0,05	--	--	--	16,5	--	--	--	--	--	3,6x10 <sup>0</sup>	--	--	--
15	15	6,91	598,31	--	--	--	30	0,5	--	--	--	--	15	0,15	--	--	--	--	160x10 <sup>0</sup>	21x10 <sup>0</sup>	23x10 <sup>0</sup>	--
16	8	6,57	688,81	--	--	--	4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	93x10 <sup>0</sup>	3,6x10 <sup>0</sup>	--	--
17	9	7,01	598,64	--	--	--	45	0,4	0,05	9	0,4	--	6	0,5	--	--	--	--	93x10 <sup>0</sup>	--	--	--
18	8	6,41	593,64	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
19	8	6,86	682,94	--	--	--	4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	93x10 <sup>0</sup>	--	--	--
20	8	6,81	682,94	--	--	--	20	0,5	--	2	--	--	1,5	--	--	--	--	--	240 x10 <sup>0</sup>	93 x10 <sup>0</sup>	--	--
21	8	6,83	692,83	9	--	--	26	0,1	--	5	--	--	4,5	--	--	--	--	--	93 x10 <sup>0</sup>	--	3,6x10 <sup>0</sup>	--
22	9	6,78	681,44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	150 x10 <sup>0</sup>	--	21 x10 <sup>0</sup>	--
23	8	6,84	596,75	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	93 x10 <sup>0</sup>	--	21 x10 <sup>0</sup>	--
24	8	7,02	677,25	--	--	--	3,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	93 x10 <sup>0</sup>	21 x10 <sup>0</sup>	--	--
25	8	6,74	512,70	6	--	--	7,5	1,4	--	9	0,1	0,01	5	0,2	--	--	--	--	15 x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--	--
26	10	6,90	666,34	--	--	--	130	1,8	--	16	1,4	--	78	3,4	--	--	--	--	150 x10 <sup>0</sup>	9,2 x10 <sup>0</sup>	9,2 x10 <sup>0</sup>	--
27	9	6,70	583,37	--	--	--	9	0,1	--	3	--	--	10	--	--	--	--	--	7,4 x10 <sup>0</sup>	3,6 x10 <sup>0</sup>	--	--
28	3	7,12	483,62	--	--	--	13	1,3	0,01	4	--	--	2,5	--	--	--	--	--	14 x10 <sup>0</sup>	--	3,6 x10 <sup>0</sup>	--
29	5	6,80	567,31	--	--	--	78	0,1	--	--	24	--	58	2,7	--	--	--	--	20 x10 <sup>0</sup>	9,2 x10 <sup>0</sup>	--	--
30	5	6,86	385,95	--	--	--	60	0,8	--	--	7	--	90	3,5	--	--	--	--	15 x10 <sup>0</sup>	--	3,6 x10 <sup>0</sup>	--