

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Correlação entre Acidez Dornic e a Contagem de
Bactérias Aeróbias Mesófilas do Leite Humano
Ordenhado a Domicílio**

Luciana Miranda Fonteles

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia para a obtenção do grau
de Bacharelado em Ciências Biológicas.**

**Uberlândia-MG
Setembro-2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Correlação entre Acidez Dornic e a Contagem de
Bactérias Aeróbias Mesófilas do Leite Humano
Ordenhado a Domicílio**

Luciana Miranda Fonteles

Dra. Daise Aparecida Rossi

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia para a obtenção do grau
de Bacharelado em Ciências Biológicas.**

**Uberlândia-MG
Setembro-2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

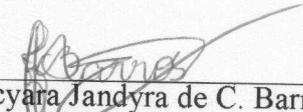
**Correlação entre Acidez Dornic e a Contagem de
Bactérias Aeróbias Mesófilas do Leite Humano
Ordenhado a Domicílio**

Luciana Miranda Fonteles

Aprovado pela comissão examinadora em 11/09/02

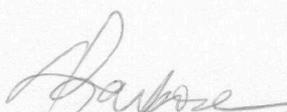
NOTA: 100,00

Daise Aparecida Rossi
(Orientadora)



Jupyrcyara Jandyra de C. Barros
(Co-Orientadora)

**Uberlândia-MG
Setembro-2002**



Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Dedico

Deus,

Pela vida. "Que bom Senhor ir ao Teu encontro, poder chegar e adentrar a Tua casa, Sentar-me Contigo e partilhar da mesma mesa".

Ofereço,

*Aos meus pais, pelo incentivo e apoio nesses anos de dedicação. Aos meus irmãos, sobrinhos, Berna e minha vó Consu meu sincero obrigado!
E principalmente a minha mãe, exemplo de sabedoria, dedicação e amor.*

Agradecimentos

Daise,

Os meus sinceros agradecimentos pela compreensão, paciência, respeito e apoio durante a realização deste trabalho e principalmente por entender os momentos que estive ausente.

Juprys,

"Há pessoas estrelas; há pessoas cometas. Os cometas passam... Apenas são lembrados pelas datas que passam e retornam. As estrelas permanecem. Os cometas desaparecem. Há muita gente cometa... Passam pela vida da gente apenas por instantes. Gente que não prende ninguém e a ninguém se prende. O importante é ser estrela, estar presente, marcar presença, estar junto e ser luz. Ser calor. Ser vida. Amar é ser estrela. Há necessidade de criar um mundo de estrelas. Todos os dias poder vê-las, senti-las, contar com elas. Assim são os amigos, estrelas na vida de gente. Ser estrela neste mundo passageiro, neste mundo cheio de pessoas cometas, é um desafio, mas acima de tudo; uma recompensa, é nascer e ter vivido e não apenas existido"

(Equipe do canto grupo de jovens)

Claudia, Fabi, Francesca, Pny, Odécio, Soninha,

*Obrigada pelos ótimos momentos que passamos no
Laboratório e pelo auxílio na realização deste trabalho.*

*Claudia, obrigada pela força nas "idas e vindas" ao
BLH.*

Ângela Maria de Moraes, funcionárias do BLH,

*Os meus sinceros agradecimentos, pelo
respeito, auxílio e disponibilidade para que
este trabalho se realizasse.*

Gismar,

*Obrigada, pela colaboração e
paciência durante a realização
deste trabalho.*

Índice

RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1. Leite humano.....	03
2.2. Banco de leite humano (BLH).....	04
2.3. Microrganismos e alteração na acidez do leite humano.....	06
2.4. Amamentação e o uso de drogas.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1. Coleta das amostras.....	09
3.2. Análises.....	09
3.3. Análise Estatística.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5. CONCLUSÃO.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

RESUMO

Com objetivo de determinar e correlacionar o número de bactérias mesófilas e o índice de acidez Dornic do leite materno coletado a domicilio, foram analisadas 40 amostras. As amostras foram coletadas pela funcionária de um Banco de Leite Humano (BLH) e pela própria doadora. A média das contagens de bactérias mesófilas do leite ordenhado pela doadora foi de $5,4 \times 10^5$ UFC/mL sendo superior à média do leite ordenhado pelas funcionárias do BLH ($5,1 \times 10^5$ UFC/mL). A diferença entre as duas formas de coleta não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A média do índice de acidez foi $5,71^\circ\text{D}$ para o leite ordenhado pelas doadoras e $4,46^\circ\text{D}$ para o leite colhido para funcionárias. A diferença entre as duas formas de coleta foi estatisticamente significativa para a análise de acidez ($p < 0,05$). O resultado da correlação entre a contagem de bactérias mesófilas e o índice de acidez Dornic foi positivo e não significativo ($r = 0,0479$). Foi verificado que algumas doadoras utilizavam medicamentos durante a amamentação, porém, o número de amostras não permitiu verificar sua influência sobre as análises realizadas. O leite das doadoras que tomavam medicamentos incompatíveis com a amamentação era descartado pelo Banco de Leite Humano.

Palavras-chaves: Banco de leite humano, acidez Dornic, bactérias aeróbias mesófilas.

1. INTRODUÇÃO

A ingestão do leite materno é fundamental para a saúde da criança, devido a sua composição, disponibilidade dos nutrientes e por seu conteúdo em substâncias imunoativas. Favorece ainda a relação afetiva mãe-filho e o desenvolvimento da criança, apresentando também a propriedade de promover o espaçamento das gestações e de diminuir a incidência de algumas doenças na mulher (BRASIL, 2001).

Por diferentes razões, sejam elas sociais, econômicas ou culturais, em muitos países tem sido observada a diminuição da prevalência e da duração da lactância natural. Também a introdução das tecnologias modernas e a adaptação de novos meios de vida estão reduzindo a importância que se concede a esta prática tradicional (OMS/UNICEF, 1989). No Brasil o processo rápido de urbanização, a introdução das mulheres no mercado de trabalho, a perda do núcleo familiar e dos valores culturais, interfere negativamente nas práticas do aleitamento materno (BRASIL, 1995). Deste modo, várias medidas foram tomadas com o intuito de incentivar o aleitamento materno, dentre elas, a implantação de bancos de leite humano no Brasil (BLH), que funcionam como um centro especializado, sem fins lucrativos, vinculados a um hospital materno e/ou infantil, responsável pelas atividades de coleta até a distribuição do leite, assegurando sua qualidade.

O leite humano ordenhado (LHO) obtido de doadoras sadias é livre de microrganismos patogênicos. Estes quando ocorrem, encontram-se vinculados a fontes externas de contaminação. Os microrganismos presentes no leite humano podem ser classificados como contaminantes primários e secundários. A microbiota primária corresponde aos microrganismos que passam diretamente da corrente sanguínea para o leite. Os contaminantes secundários incluem os microrganismos provenientes da manipulação do produto em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (PASCHOA, 1997).

A qualidade microbiológica do leite humano ordenhado (LHO), manipulado e

processado por um Banco de Leite Humano é uma função direta dos procedimentos técnicos e higiênico-sanitários adotados desde a coleta até a distribuição. A magnitude dos contaminantes iniciais, veiculados ao leite no transcorrer da ordenha, exerce efeito decisivo sobre a qualidade final do produto. Assim, a presença de contaminantes em níveis elevados no leite humano cru acarreta a redução do valor biológico e/ou a desqualificação do produto para o consumo, tendo em vista a vulnerabilidade da clientela receptora (ALMEIDA apud ALMEIDA et al., 1989).

O leite humano é considerado ácido se apresentar acidez acima de 8°D. Um valor acima deste é proveniente da acidificação do leite causada pela degradação da lactose pelos microrganismos. Assim, a acidez do leite pode aumentar, por influência da temperatura e, principalmente, pela falta de higiene com os equipamentos usados durante a coleta ou ordenha do leite.

Uma correlação entre acidez Dornic e o número de bactérias no leite poderia evidenciar a associação entre estas duas variáveis, permitindo assim a utilização da acidez como um método de triagem na avaliação do controle da qualidade do leite humano.

Desse modo, o presente trabalho possuiu como objetivos verificar em leite humano ordenhado e recebido no Banco de Leite do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia:

- Se existe correlação entre as provas de acidez Dornic e número de bactérias mesófilas;
- Os índices de acidez Dornic e a contagem de bactérias mesófilas;
- Se o tipo de ordenha utilizado (por funcionárias ou pela própria doadora) interferia nos resultados obtidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leite Humano

O leite humano é o melhor alimento para a criança nos primeiros seis meses de vida. É fundamental para a saúde e o desenvolvimento da criança devido sua propriedade nutritiva. (BRASIL, 1995). Representam fatores de superioridade do leite humano a melhor digestibilidade, a composição balanceada, a ausência de fenômenos alergênicos, a proteção conferida contra infecções e o favorecimento do relacionamento afetivo mãe-filho, além do reduzido número de bactérias (BRASIL, 2001).

O leite materno é uma substância de complexidade biológica, ativamente protetora e imunomoduladora, apresentando proteção contra infecções e alergias, além de estimular o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do bebê (PASCHOA, 1997).

A composição química do leite materno corresponde perfeitamente às necessidades nutricionais e atende às peculiaridades fisiológicas do metabolismo do recém-nascido (BRASIL, 2001). No referente ao teor de gorduras, este é menor no colostro e vai aumentando ao longo do período de lactação e contém quantidade necessária para ingestão energética diária da criança. A lactose é o principal carboidrato do leite humano, fornecendo 49% das necessidades energéticas. As principais vitaminas presentes são A, B1, B2, B6, B12, C, E, K, niacina e ácido fólico, sendo que os teores no leite materno variam de acordo com a ingestão materna. Os sais minerais presentes no leite materno satisfazem perfeitamente as necessidades nutritivas. Estão presentes ainda as imunoglobulinas IgA, IgM, IgC, IgD e IgE sendo que a IgA apresenta-se em maior quantidade no colostro na forma de IgA secretora, além de componentes celulares como macrófagos e linfócitos, que dão ao leite materno propriedades anti-infecciosas (PASCHOA, 1997) ou atuam como agentes de proteção no organismo do lactente.

O colostro é o primeiro produto da secreção láctica e permanece, em média, até o sétimo dia após o parto. Este é gradativamente substituído pelo leite, um líquido branco e opaco, dotado de pouco odor, com sabor levemente adocicado. Observa-se ainda a ocorrência do leite de transição, produzido no período em que o colostro começa a ser substituído pelo leite propriamente dito (BRASIL, 2001).

2.2. Banco de leite humano (BHL)

O desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao aleitamento Materno (PNIAM), ocorrido a partir de 1981, resultou na retomada da valorização do leite materno. Nesse sentido, para atender aos lactentes clinicamente impossibilitados de serem amamentados por suas próprias mães, tornou-se crescente a necessidade de leite humano ordenhado disponível e, conseqüentemente, o surgimento de Bancos de Leite Humano (BRASIL, 2001).

O BLH é um centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e pela execução das atividades de coleta, processamento, controle de qualidade e distribuição de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição de médicos ou nutricionistas, sendo esse vinculado a um hospital materno e/ou infantil (INAN, 1993). É de responsabilidade do Banco de Leite Humano orientar, executar as operações de controle de qualidade, distribuição e a promoção do aleitamento materno (BRASIL, 2001).

A clientela assistida pelos bancos de leite humano, além de gestantes e nutrízes, compreende principalmente prematuros e recém nascidos de baixo peso que não sugam, os com infecção, especialmente com enteroinfecções, portadores de deficiências imunológicas e portadores de alergia a proteínas heterólogas e, ainda, lactentes sadios (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Um BLH deve possuir localização adequada, afastado de outras dependências que possam causar prejuízos à obtenção higiênica do leite, sendo necessário evitar os cruzamentos de fluxos. O piso, paredes, teto e divisórias devem ser revestidos com material impermeável de modo a facilitar as operações de limpeza e sanitização, as quais devem ser realizadas rigorosamente antes de cada turno de trabalho. Em se tratando de coleta domiciliar, a doadora deve ser orientada para procurar um local tranqüilo, evitando aqueles que tragam risco à

qualidade microbiológica do leite coletado, como os próximos a sanitários e/ou dependências onde se encontrem animais domésticos (ALMEIDA *et al.* 1998).

As doadoras são mulheres sadias, que apresentam secreção lática superior às exigências de seus filhos e que se dispõem a doar o excedente espontaneamente. As voluntárias passam por uma anamnese e posterior exame sorológico para avaliar os possíveis risco de saúde.

Todas as pessoas que entram em contato direta ou indiretamente com o leite humano coletado seja pelo contato com equipamentos, embalagens, envolvidas no transporte ou beneficiamento do leite, são considerados manipuladores. Os manipuladores que trabalham em bancos de leite humano, devem ser submetidos a exames periódicos de saúde, estabelecidos pela equipe de saúde do BLH, de acordo com as normas da Secretaria de Saúde através da Vigilância Sanitária do local onde se encontra o BLH (ALMEIDA *et al.*, 1998).

A adoção de um sistema preventivo e dinâmico de controle de qualidade assume particular importância para os Bancos de Leite, pois reduz os riscos operacionais, garantindo a qualidade do produto e a saúde do lactente (SOUSA *et al.*, 2001). Este controle é realizado ao longo de todo o processo e baseia-se no emprego de técnicas adequadas no preparo de material, pelos funcionários e doadoras, nas condições higiênicas, orientação técnica sobre a condição de coleta; estocagem, distribuição e transporte do leite materno (FIOCRUZ, 2002).

A rotina no Banco de Leite Humano inicia com a coleta, que representa a primeira etapa na manipulação do leite humano ordenhado e é composta por um conjunto de atividades que vão desde a massagem e ordenha até a pré-estocagem do produto. A coleta pode ser realizada por pressão manual ou com auxílio de bombas manuais ou elétricas, em salas ou recintos apropriados, localizados nos Bancos de Leite, em enfermarias, nos postos de coleta ou na residência. Os funcionários do Banco de Leite devem ser devidamente treinados e as doadoras orientadas para manter padrões de higiene durante o processo da coleta. Além disso, o ambiente e o local da coleta, no banco do leite ou no domicílio, os equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, o transporte de leite, o acondicionamento e embalagem do leite humano devem estar de acordo com padrões técnicos e higiênicos sanitários.

O leite humano deve ser transportado do local de coleta ao Banco de Leite em caixas isotérmicas contendo gelo, de modo a manter o leite a baixas temperaturas, evitando a proliferação de microrganismos. O produto cru, ao chegar no BLH, deve ser imediatamente submetido à seleção e à classificação e ao tratamento de conservação específico. O

acondicionamento e embalagem (reenvase) devem ser feitos certificando-se que os frascos para reenvase foram corretamente esterilizados.

A pasteurização, no caso do leite humano, é realizada submetendo o leite à temperatura de 62-65°C, por 30 minutos, com a finalidade de destruir todos os microrganismos patogênicos e a grande parte da microbiota saprófita presente. Posteriormente, o leite é resfriado (gelo) a 5°C por uma hora. O leite humano processado pode ser estocado congelado por até seis meses. Obrigatoriamente, deve ser previamente rotulado contendo as todas as informações necessárias, como data da embalagem, validade e origem. É vetada a estocagem do leite humano ordenhado com outros produtos hospitalares.

Quanto à distribuição, o leite humano ordenhado deve ser distribuído de acordo com os critérios estabelecidos pela Portaria 322/88 do Ministério da Saúde, respeitando a seguinte indicação: prematuros e recém-nascidos de baixo peso que não sugam, recém-nascidos infectados, portadores de deficiências imunológicas, portadores de diarreia protraída, portadores de alergia a proteínas heterólogas e outros casos excepcionais (ALMEIDA, 2001).

2.3 Microrganismos e alteração na acidez em leite humano

As bactérias mesófilas correspondem à grande maioria da microbiota de importância em alimentos, sendo que a contagem destes microrganismos é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos não fermentados (FRANCO & LANGRAF, 1996). Possuem temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, mínima entre 5°C e 25°C e máxima entre 40°C e 50°C.

A contagem padrão de bactérias mesófilas tem sido utilizada como indicadora da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo idéia sobre seu tempo útil de conservação (SIQUEIRA, 1995). Sua presença em grande número indica matérias-primas excessivamente contaminadas, limpeza e desinfecção de superfícies ineficiente, deficiente higiene na produção e condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos, ou, ainda, uma combinação destes fatores (GUERREIRO, 1984).

A acidez do leite pode aumentar devido a hidrólise da lactose por enzimas microbianas, que levam a formação de ácido láctico. Se esta acidez desenvolvida for superior à normal, o leite pode se tornar inadequado para o consumo, alterar seu sabor e suas

propriedades biológicas. Além disso, indica alta atividade bacteriana que podem ser consequência de condições inadequadas de higiene durante o processo de coleta e/ou ordenha do leite humano. A acidez, portanto, tende a aumentar conforme o envelhecimento do leite, influenciando na sua estabilidade térmica frente aos tratamentos sofridos pelos mesmos (SILVA, 1997).

O método de Dornic é o mais generalizado no Brasil para a pesquisa rápida e exata do grau de acidez do leite de vaca, indicando o estado de conservação e eventuais anormalidades do produto (TRONCO, 1997).

Existe uma preocupação com a qualidade do leite humano que é dado aos pacientes prematuros. Esta tomada de consciência fez com que houvesse um investimento maior em tecnologia nos BLH (LEITE, 2000). A utilização de indicadores físico-químicos para controlar a qualidade do leite humano ordenhado representa uma alternativa capaz de compatibilizar o custo operacional do controle com as exigências nutricionais dos consumidores.

O grau de acidez Dornic pode se tornar um bom teste de triagem como indicador da qualidade do leite materno que chega aos BLH. Para determinação da acidez em graus Dornic (°D) pode ser utilizada para titulação, uma solução de NaOH (0,11N) e a fenolftaleína como indicador do ponto de viragem (pH 6,6 a 8,3). Dornic propôs o uso de uma solução de soda N/9 e deu o nome de graus aos décimos de mililitros (0,1mL) dessa solução, que corresponde a 0,001g (uma miligrama de ácido láctico), logo, cada 0,1ml de solução Dornic gastos na titulação corresponde a 1°D ou 0,01grama de ácido láctico/litro (TRONCO, 1997). Os valores médios de acidez Dornic para o leite humano são de 3°D a 4°D, podendo ser considerados como aceitáveis valores menores que 8°D. A titulação é um teste que deve realizado assim que o leite chegar ao Banco de Leite Humano (FIOCRUZ, 2002).

2.4. Amamentação e o uso de drogas

As maiorias das drogas utilizadas durante a amamentação são excretadas no leite materno. A quantidade excretada por essa via é pequena e dependente do princípio ativo. Pode ainda, ser ou não absorvida no trato gastrointestinal da criança. O conhecimento a respeito de drogas e lactação embora esteja muito ampliado, ainda não elucidou todos os efeitos sobre a criança de muitas drogas utilizadas pela nutriz. Além disso, muitas drogas novas não relatam o percentual e os efeitos de sua excreção pelo leite materno. Atualmente,

há uma tendência em reduzir o número de drogas consideradas como incompatíveis ou contraindicadas durante a amamentação. A indicação criteriosa do tratamento e a seleção cuidadosa dos medicamentos, geralmente permitem que a amamentação continue sem interrupção e com segurança.

As drogas podem ser administradas às mães por diversas vias, tais como, oral, injetável venosa ou intramuscular, supositórios, aerossol, tópico por meio de pomadas e cremes. Uma vez no sangue materno, os medicamentos podem ser transferidos parcialmente para a glândula mamária e, daí, serem excretados para o leite. Assim, a presença e/ou concentração da droga no leite dependerá entre outros fatores da via de administração à mãe. O fator determinante da quantidade de droga que aparece no leite é a sua concentração no sangue materno.

Durante a lactação, a passagem de drogas do sangue para o leite materno ocorre através de mecanismos envolvendo membranas biológicas, as quais possuem em sua constituição proteínas e fosfolipídios. É estimado que a quantidade de um medicamento excretado no leite não ultrapasse a 2% da dose administrada à mãe. Os mecanismos mais prováveis de excreção de drogas para o leite materno são: difusão transcelular, difusão passiva, difusão intercelular e ligação com proteínas carreadoras (BRASIL, 2000).

Dentre os medicamentos que podem ser excretados pelo leite encontram-se os antibióticos. As diferentes bases farmacológicas têm sido estudadas e seus efeitos no lactente constam em manuais que são utilizados pelos BLH. O estudo individual de cada caso permite ao responsável pelo BLH decidir sobre o aproveitamento ou não do leite doado. Porém, além dos efeitos diretos sobre o lactente, a ação dos antimicrobianos deve ser também avaliada sobre os testes utilizados pelo controle de qualidade do BLH. Como os controles são baseados principalmente na quantificação de bioindicadores como bactérias mesófilas, grupo coliforme e, mais recentemente, a acidez, deve-se sempre levar em consideração que o uso desses medicamentos pode levar a interpretações equivocadas dos resultados obtidos.

Vale ressaltar que, o uso de drogas utilizado para o controle da hipertensão deve ter uso criterioso durante a lactação, porque podem ser excretados no leite materno em concentrações variadas. Como essas drogas são compatíveis com a amamentação, os leites das doadoras foram aproveitados pelo BLH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

A rotina de coleta do leite humano ordenhado no BLH-HC/UFU pode ser realizada de duas formas: a) pelas funcionárias, utilizando bombas elétricas e obedecendo a rigorosos padrões de higiene; b) pelas próprias doadoras, que fazem a ordenha por pressão manual e o armazenam em mamadeiras previamente esterilizadas, para depois ser recolhido. Foram analisadas 16 amostras coletadas diretamente pela doadora e 24 amostras colhidas pela funcionária do BLH-HC-UFU, totalizando 40 amostras de leite.

As amostras foram conduzidas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal Uberlândia (LABIO-UFU), onde foram analisadas quanto ao número de bactérias mesófilas e acidez Dornic.

No momento da coleta, foram realizadas perguntas sobre a data do início da lactação e o uso de medicamentos durante a lactação. Quando era detectado o uso de medicamentos como antibióticos, que influenciam na microbiota do leite, os resultados destas amostras não era utilizado no tratamento dos dados.

3.2. Análises

Para enumeração das bactérias mesófilas, foi utilizada a metodologia proposta por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992), onde 1mL da amostra foi diluída em 9mL de água peptonada estéril (APT), sendo esta, considerada a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição foram realizadas diluições seriadas, das quais foram inoculadas em duplicata alíquota de 1mL

em placas de Petri estéreis e adicionados 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA), previamente fundido e resfriado a 45°C. As placas foram, então, homogeneizadas e, após solidificação, incubadas em posição invertida em estufa a 35°C/48 horas. O resultado obtido foi registrado como unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) após os números encontrados nas placas serem multiplicados pela recíproca da diluição utilizada.

Foram determinados os índices de acidez de todas as amostras. O método utilizado foi o Dornic, utilizando 10 mL da amostra de leite previamente homogeneizado, 3 a 5 gotas de fenolftaleína a 2% como indicador e hidróxido de sódio N/9 para titulação. Para cálculo de acidez, cada 0,1 mL do NaOH N/9 gasto foi correspondente a 1° D (BRASIL, 1997).

3.3. Análise Estatística

O delineamento utilizado foi o DIC (delineamento inteiramente casualizado) a 5% de probabilidade. Para verificar se houve diferenças estatísticas nas contagens de bactérias mesófilas e nos índices de acidez entre o leite humano colhido pela doadora e pela funcionária do BLH-HC/UFU, foram realizadas análises de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados de acidez foram correlacionados com o número total de bactérias pelo teste de correlação de Pearson a 5% de probabilidade em ambas formas de ordenha do leite (SAMPAIO, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 40 amostras analisadas foram classificadas como leite humano cru por não ter sofrido nenhum tipo de tratamento térmico. Os resultados médios das contagens de bactérias aeróbias mesófilas do leite coletado pela própria mãe e pela funcionária do BLH não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Porém, como pode ser observado na Figura 1, a média das contagens do leite ordenhado pelas mães ($5,4 \times 10^5$ UFC/mL) foi superior à média do leite ordenhado pelas funcionárias do BLH ($5,1 \times 10^5$ UFC/mL).

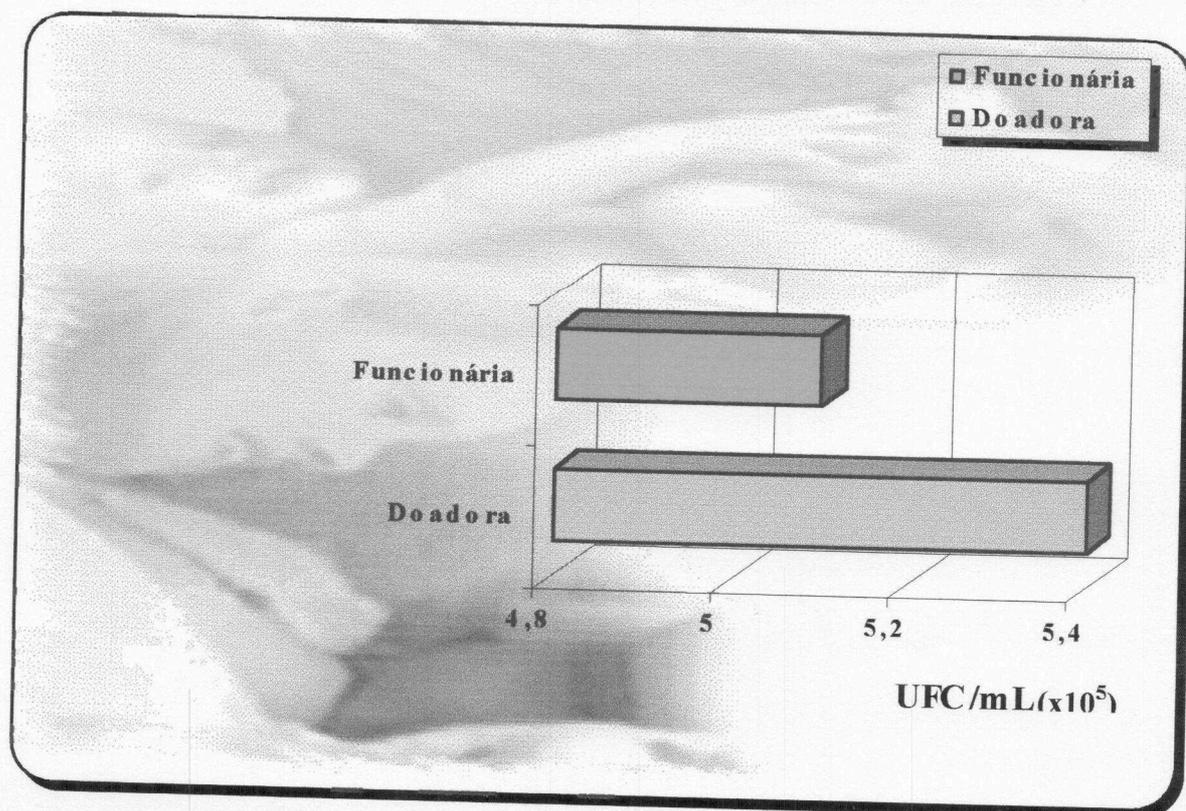


Figura 1. Contagem média de bactérias mesófilas no leite materno ordenhado pela doadora e por funcionárias de BLH.

Como não existem padrões para contagem de leite humano ordenhado cru, os resultados foram comparados com o preconizado pelo Ministério da Saúde para leite humano já pasteurizado. A resolução RDC número 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, especifica o número máximo de 10^2 UFC/mL (ANVISA, 2001).

SOUSA et al. (2001) ao analisar as condições higiênico-sanitárias de leite humano cru, ordenhado em um BLH na cidade de Uberlândia – MG, detectou índices superiores de microrganismos mesófilos nas amostras colhidas pelas doadoras. Tal fato, também foi evidenciado no presente estudo, revelando, possivelmente, ausência e/ou precária sanitização dos utensílios, bem como higienização insuficiente do pessoal envolvido durante a coleta (SOUSA et al., 2001). Provavelmente, a adoção de luvas, gorro, máscara, bombas elétricas e materiais estéreis, como sugerido por ALMEIDA (1988), reduziriam os valores encontrados.

Embora, haja um monitoramento rigoroso durante a ordenha realizada pelas funcionárias, foi verificado nessas amostras valores superiores a 10^6 UFC/mL. Para melhor visualização, as contagens em UFC/mL foram divididos em classes de acordo com a frequência encontrada (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência na contagem de bactérias mesófilas (UFC/mL) no leite humano ordenhado a domicílio por funcionários e doadoras do BLH.

DOADORA			FUNCIONÁRIA		
UFC/ mL	Frequência	%	UFC/ mL	Frequência	%
10^2	2	12,50	10^2	1	4,54
10^3	6	37,50	10^3	7	31,82
10^4	4	25,00	10^4	5	22,73
10^5	1	6,25	10^5	5	22,73
10^6	3	18,75	10^6	1	4,54
$>10^6$	—	—	$>10^6$	3	13,64
Total	16	100	Total	22	100

Os índices de acidez Dornic apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com valores médios de $5,71^\circ\text{D}$ e $4,46^\circ\text{D}$, para o leite ordenhado pela nutriz e para o leite ordenhado pela funcionária, respectivamente (Figura 2).

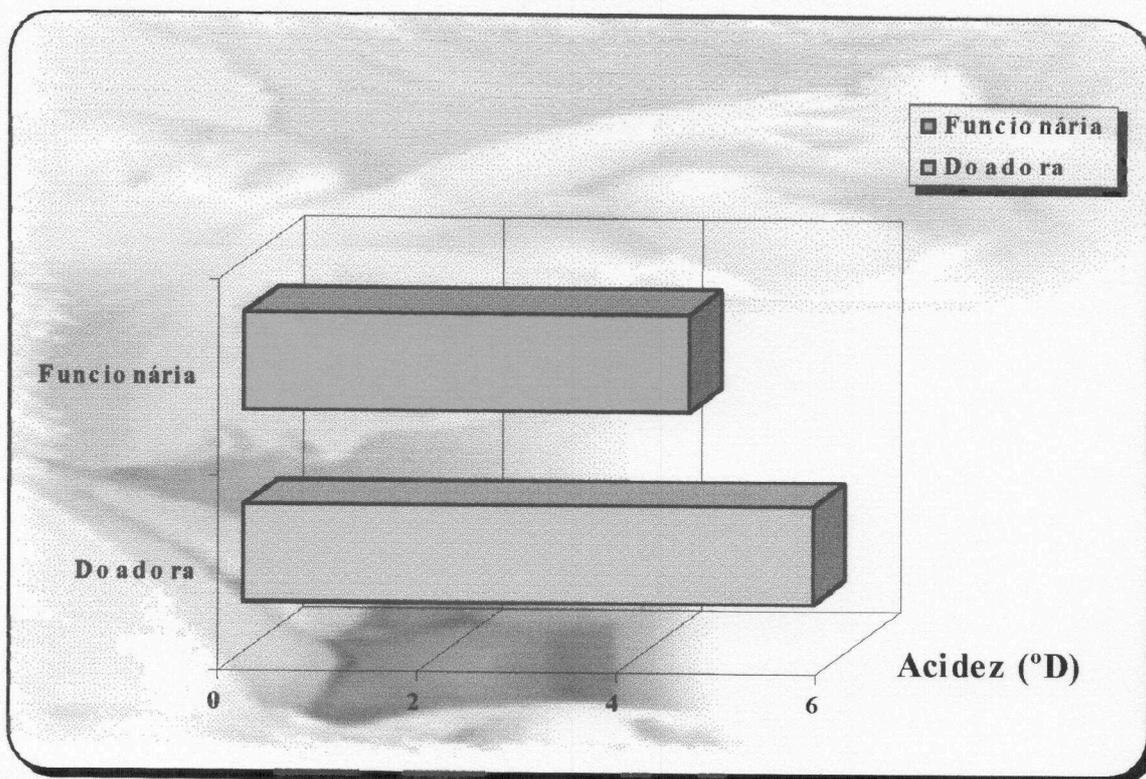


Figura 2. Índices médios de acidez Dornic no leite humano ordenhado pela doadora e funcionária do BLH.

Conforme pode ser observado na tabela 2, os dados obtidos foram divididos em classes, tomando por base a frequência dos valores de acidez Dornic de cada amostra. A faixa compreendida entre 3°D e 4°D representou a maioria das amostras analisadas (31,25%) para o leite colhido pela nutriz, entretanto, vale mencionar que valores extremos (3°D e 13°D), também foram encontrados. As amostras coletadas pelas funcionárias mostraram comportamento semelhante, porém, com 59,09% na faixa entre 3°D a 4°D e nenhuma mostra apresentou acidez acima de 7°D.

Por não haver um padrão federal estabelecido para faixa de acidez do leite humano, diferentes padrões são preconizados por instituições que mantêm BLHs. Neste estudo, foram adotados índices de acidez estabelecidos pelo Banco de Leite do Instituto Fernandes Figueira IFF/FIOCRUZ e o BLH da Maternidade Odete Valadares, uma instituição ligada à Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG).

Tabela 2. Frequência do índice de acidez ($^{\circ}$ D) do leite humano ordenhado por funcionárias e doadoras em um Banco de Leite Humano.

DOADORA			FUNCIONÁRIA		
Acidez (D°)	Frequência	%	Acidez(D°)	Frequência	%
3 — 4	5	31,25	3— 4	13	59,09
4 — 5	4	25	4 —5	5	22,72
5 —6	3	18,75	5 —6	2	9,09
6— 7	2	12,50	6— 7	2	9,09
7— 8	1	6,25	7— 8	—	—
>8	1	6,25	>8	—	—
Total	16		—	22	

Considerando os índices preconizados pela Maternidade Odete Valadares (2,5 a 5,5 $^{\circ}$ D), 73,68% das amostras coletadas estavam dentro do padrão, enquanto que, o limite adotado pela FIOCRUZ (1 a 8 $^{\circ}$ D), 97,38% do total das amostras analisadas estariam adequadas. Individualmente, somente uma das amostras (coletada pela doadora) apresentou acidez acima de 8 $^{\circ}$ D (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de amostras com acidez Dornic aceitável em BLHs, considerando índices máximos preconizados por duas instituições.

ACIDEZ DORNIC (%)		
Leite ordenhado	Fiocruz (%)	Maternidade Odete valadares (%)
Doadoras	95,8	56,25
Funcionárias	100	86,36
Total	97,38	73,68

Quando foram correlacionados os índices de acidez Dornic com as contagens de bactérias mesófilas, foi obtida uma correlação positiva e não significativa ($r=0,0479$). A correlação realizada, separadamente, para o leite ordenhado pela própria doadora e pela funcionária do BLH foi determinada e mostrou a mesma tendência, com $r=0,1834$ e $r=0,1416$,

respectivamente. SILVA & ALMEIDA (2001) estudando a curva de crescimento de bactérias mesófilas em leite humano recém ordenhado cru x acidez Dornic verificaram que os valores da acidez do leite materno cru (coloostro e leite maduro) mantidos à temperatura de 37°C não sofreram variações significativas nas primeiras horas, aumentando após 4 a 8 horas, posteriormente à ordenha e de forma considerável quando incubado por 16 horas. Os autores observaram também que, há diferenças significativas nos valores de acidez Dornic e contagens de mesófilas se forem comparados leite maduro e coloostro. Quando as amostras eram submetidas em banho-maria por mais de 4 horas, houve um acréscimo do número de bactérias, elevando o índice da acidez. O mesmo fato não ocorreu de forma acentuada no coloostro, o que foi atribuído a maior quantidade de enzimas e imunoglobulinas presentes no coloostro. O leite maduro ficaria mais susceptível ao crescimento bacteriano devido sua composição já diferenciada.

Os resultados obtidos no presente trabalho não puderam ser, objetivamente, comparados aos resultados de SILVA & ALMEIDA (2001), que analisaram leite materno maduro e coloostro mantido a 37°C por até 16 horas. Nesse estudo, o leite colhido pelas funcionárias do BLH era refrigerado após coleta e imediatamente encaminhado à análise. O leite ordenhado pela doadora também era imediatamente refrigerado ou congelado e não foi possível estipular o tempo decorrido desde a ordenha até a análise, impossibilitando a análise estatística desta variável sobre os resultados obtidos.

Vale suscitar que, algumas amostras apresentaram um perfil de acidez Dornic bastante elevado. Provavelmente, esses valores são decorrentes da ingestão de medicamentos pela nutriz que, possivelmente interferiram nos resultados das análises. Desta forma, seria relevante acrescentar aos testes de triagem do banco de leite humano, o monitoramento do efeito das drogas na qualidade microbiológica e físico-química do leite humano ordenhado.

5. CONCLUSÕES

Os resultados das contagens de bactérias aeróbias mesófilas e dos índices de acidez Dornic de 40 amostras de leite humano ordenhado a domicílio permitem concluir:

- A correlação entre a média do número de bactérias mesófilas e o grau de acidez Dornic das amostras não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).
- A contagem média de bactérias mesófilas foi de $5,1 \times 10^5$ UFC/mL e $5,4 \times 10^5$ UFC/mL nos leites ordenhados pelas funcionárias e doadoras, respectivamente. A diferença entre as duas formas de coleta não foram estatisticamente significativa ($p > 0,05$).
- O índice médio de acidez Dornic foi de $4,46^\circ\text{D}$ e $5,71^\circ\text{D}$ nos leites ordenhados pelas funcionárias e doadoras, respectivamente. A diferença entre as duas formas de coleta foram estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. G. de et al. **Recomendações técnicas para funcionamento de banco de leite humano**. Brasília: Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Ministério da Saúde, 1998. 48p.
- ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; ALMEIDA, C. H. G.; SERVA, V. B. Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. **Revista do IMIP**, v.3, nº.1, p. 13-16, 1989.
- ANVISA. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 1 set. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes I: métodos microbiológicos**. Brasília, 1997.68p
- BRASIL. Ministério da Saúde/OPAS. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. **Promoção do aleitamento materno: texto básico para apoio ao ensino do aleitamento nas escolas de saúde**. 2.ed. Brasília, DF, 1995. 38p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Amamentação e o uso de drogas**. Brasília, 2000. 72p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite**. 4. ed. Brasília, 2001. 48p.
- FIOCRUZ. Manual Técnico. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/redeblh/manualtecnico>>. Acesso em: 14 fev. 2002.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 170 p.
- GUERREIRO, M. G. **Bacteriologia especial: com interesse à saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.205p.

- INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. **Recomendações técnicas para funcionamento de banco de leite humano**. 2. ed. Brasília, 1993.
- LEITE. *Jornal HC*, Curitiba, Jul. 2000. Disponível em: <http://www.hc.ufpr.br/jornalhcjulho2000/conteudo/geral/leite.html>. Acesso em: 28 fev. 2002.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Protección, promoción y apoyo de la lactancia natural**: la función especial de los servicios de maternidad: Declaración Conjunta OMS/UNICEF. Ginebra, 1989. 53p.
- PASCHOA, M.F. Pasteurização do leite materno: vantagens e desvantagens. *Revista. Higiene Alimentar*, v.11, n°50, p. 14-19, 1997.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- ✓ SILVA, P. H. F. "Leite; aspectos da composição e propriedades". *Química Nova da Escola*, n°6, 1997. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp.br/quimica/experimentos/ensinomedio/leite>. Acesso: 28 fev.2002.
- SILVA, V. G., ALMEIDA, J. A. G. Curva de crescimento bacteriano em leite humano recém-ordenhado x acidez Dornic. In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE. 1,2001, Riberão Preto. Anais.Riberão Preto: 2001.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 1995. p. 73-120.
- SOUSA, R. P.; SILVA, V. A, ROSSI, D. A, BARROS, J.J.C., OLIVEIRA, A M.M. Avaliação microbiológica do leite humano ordenhado e beneficiado em um banco de leite humano. *Revista. Instituto. Laticínio*. "Cândido Tostes", n°322, p.30-32,2001.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFMS, 1997. 220 p.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.